

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Bakteriologie

Vorstand: Prof. Dr. Jürgen Heesemann

**Woronin Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphen-
Septum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses
pathogenen Schimmelpilzes**



DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Julia Beck

aus

München

Dezember 2013

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Frank Ebel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Sven Krappmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2014

Eidesstattliche Versicherung

Beck, Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Woronin Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphen-Septum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses pathogenen Schimmelpilzes

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Der filamentöse Pilz <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.1.1 Bedeutung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.1.2 Lebenszyklus - von der ruhenden Spore zum Myzel	3
1.1.3 Medizinische Bedeutung	5
1.1.4 Ein Pilz - drei Krankheiten: <i>Aspergillus fumigatus</i> und Aspergillosen ...	6
1.2 Das Myzel filamentöser Pilze - Interzelluläre Kommunikation	11
1.3 Septen filamentöser Pilze	13
1.4 Woronin Körper filamentöser Pilze - Verschluss der septalen Pore	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Publikationen	23
2.1 Beck, J., Wagener, J., Ebel, F., 2013a. The septal cell wall of filamentous fungi. The fungal cell wall. Editor Hector Manuel Mora-Montes, Nova Biomedical, Chapter 5, 129-142.	24
2.2 Beck, J., Ebel, F., 2013b. Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold <i>Aspergillus fumigatus</i> . Int J Med Microbiol. 303(2), 90-97.	47
2.2.1 Ergänzende Daten	55
2.3 Beck, J., Echtenacher, B., Ebel, F., 2013c. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould <i>Aspergillus fumigatus</i> and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. Mol Microbiol. 89 (5), 857-871	57
2.3.1 Ergänzende Daten	72
3. Diskussion	77
3.1 Woronin Körper in <i>Neurospora crassa</i>	77
3.2 Woronin Körper in <i>Aspergillus fumigatus</i>	79
3.3 Entstehung von Woronin Körpern aus Peroxisomen	80

3.4 Verteilungsmuster von Woronin Körpern	81
3.5 Woronin Körper: Verschluss der septalen Pore bei drohender Gefahr	82
3.6 Verankerung von Woronin Körpern am Septum durch das <i>Tether</i> -Protein Lah	83
3.7 Ausblick	88
4. Zusammenfassung	89
5. Summary	92
Abkürzungsverzeichnis	95
Literaturverzeichnis	96
Danksagung	102
Lebenslauf	103

1. Einleitung

Mikroorganismen beeinflussen das Leben des Menschen auf vielfältige Art und Weise. Ob als Bestandteil der Normalflora des menschlichen Körpers oder als krankheitsauslösender Keim-Mikroorganismen stehen im ständigen Kontakt mit dem humanen Organismus. Durch Mikroorganismen ausgelöste Infektionserkrankungen haben im Verlauf der Geschichte zu deutlichen Einschnitten in der Bevölkerungsdichte und teilweise zu Veränderungen in der Gesellschaftsstruktur des Menschen geführt. Seither hat die Wissenschaft mit der Entwicklung von Impfstoffen und Antibiotika große Fortschritte im Kampf gegen Infektionskrankheiten gemacht. Dennoch stellen diese noch immer die häufigste Todesursache dar. Verantwortlich dafür sind neben Bakterien und Viren auch einzellige Lebewesen, Würmer und Pilze. Pilze haben als Ursache für Infektionskrankheiten beim Menschen traditionell eine weitaus geringere Rolle gespielt als bakterielle Infektionserreger. Sie haben ein vergleichsweise geringes pathogenes Potenzial und werden vom Immunsystem gesunder Menschen normalerweise effizient eliminiert. Pilze stellen damit typische opportunistische Krankheitserreger dar. Bedingt durch die zunehmende Zahl von Patienten mit Immundefekten, beispielsweise AIDS, oder schweren Krankheiten, beispielsweise Krebs, wandelte sich dieses Bild in den letzten Jahren jedoch zunehmend (Dagenais and Keller, 2009).

Pilze sind allgegenwärtig. Sie besetzen jede nur denkbare ökologische Nische, von aquatischen Lebensräumen und der Luft bis hin zum Erdreich. Mehr als 100.000 pilzliche Arten wurden bisher identifiziert, Schätzungen gehen jedoch von weit mehr als 1,5 Millionen pilzlicher Organismen aus (Hawksworth, 2001). Von den bis heute beschriebenen Pilzarten stellt lediglich eine überschaubare Anzahl eine mehr oder weniger große Bedrohung für den Menschen dar. Als klinisch besonders relevant gilt die Gattung *Aspergillus*, allerdings werden davon nur ca. 40 Arten als humanpathogen angesehen (Klich, 2006), wobei *A. fumigatus* die mit Abstand größte klinische Relevanz zukommt (Latge, 1999).

1.1 Der filamentöse Pilz *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Bedeutung von *Aspergillus fumigatus*

Von den bekannten *Aspergillus*-Arten ist *A. fumigatus* mit 90% das am häufigsten vorkommende klinische Isolat (Denning, 1998). Die Schimmelpilzgattung *Aspergillus* wurde erstmals 1729 durch den italienischen Gärtner und Botaniker Pietro Antonio Micheli, der die morphologische Ähnlichkeit der Konidiophoren (Sporenträger) mit einem Aspergill (Weihwasserwedel) verglich, beschrieben. Die Art *A. fumigatus* wurde 1863 von dem deutschen Arzt und Botaniker Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben (Fresenius, 1863). *Fumigatus* leitet sich von dem lateinischen Wort *fumus*, Rauch, ab. Namensgebend hierbei ist die rauchgrüne Färbung der pigmentierten Sporen bzw. die rauchartigen Konidienwolken (griechisch *konia*, Staub), die durch Luftbewegungen freigesetzt werden. Asco-Sporen stellen dabei die sexuelle Verbreitungsform dar, Konidien hingegen die asexuelle. Bislang sind ca. 200 unterschiedliche *Aspergillus*-Arten bekannt, wobei einige aufgrund ihrer Primär- oder Sekundärmetabolite von industriellem Interesse sind. So wird beispielsweise *A. niger* gewöhnlich für die kommerzielle Herstellung von Zitronensäure und verschiedenen Enzymen wie Amylasen, Pektinasen, Phytasen und Proteasen genutzt (Dagenais and Keller, 2009). *A. oryzae* wird zur Herstellung von asiatischen Nahrungsmitteln und Getränken verwendet, durch Fermentation von Sojabohnen und Reis zu Sojasauce sowie Sake (Carlile *et al.*, 2001). Auch in der pharmazeutischen Industrie findet die Gattung *Aspergillus* Anwendung, so wird beispielsweise *A. terreus* zur Gewinnung des Wirkstoffs Cyclosporin A und des Cholesterin-senkenden Lovastatin eingesetzt (Hajjaj *et al.* 2001, Sallam *et al.* 2003).

Nachdem Schimmelpilze der Art *A. fumigatus* lange dem Taxon der Deuteromycota oder *fungi imperfecti*, denen kein sexueller Fortpflanzungszyklus nachgewiesen werden kann, zugeordnet wurden, konnten diese 2009 aufgrund des Nachweises einer sexuellen Reproduktion in die Klasse der Ascomyceten aufgenommen werden. Die teleomorphe Form wurde *Neosartorya fumigata* genannt (O’Gorman *et al.*, 2009). Die taxonomische Einordnung von *A. fumigatus* ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Domäne:	<i>Eucaryota</i>
Reich:	<i>Fungi</i> (Pilze)
Abteilung:	<i>Ascomycota</i> (Schlauchpilze)
Klasse:	<i>Ascomycetes</i> (Echte Schlauchpilze)
Unterklasse:	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordnung:	<i>Eurotiales</i>
Familie:	<i>Trichocomaceae</i>
Gattung:	<i>Aspergillus</i> (Gießkannenschimmel)
Hauptarten:	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i>

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von *A. fumigatus*

1.1.2 Lebenszyklus - von der ruhenden Spore zum Myzel

Der Schimmelpilz *A. fumigatus* findet sich in der freien Natur hauptsächlich in seiner primären ökologischen Nische, dem Erdboden oder der verrottenden Vegetation, wieder. Aufgrund zahlreicher sekretierter Enzyme und Proteasen ist er in der Lage nahezu alle in organischem Abfall befindlichen Makromoleküle zu einfachen Verbindungen zu zersetzen. Dieser saprotrophe Organismus übernimmt dabei eine signifikante Rolle beim globalen Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff aus sich zersetzender Biomasse (Latge, 1999). *A. fumigatus* zählt zu den thermotoleranten Organismen. Wachstum erfolgt über einen Temperaturbereich von 30-55°C, Überleben ist bei Temperaturen von bis zu 70°C nachweisbar (Abad *et al.*, 2010). Die optimale Wachstumstemperatur liegt dabei bei 37°C. Nicht nur die Anpassung an verschiedenste Umweltbedingungen und die Fähigkeit, eine Vielzahl organischer Verbindungen als Nährstoffe zu nutzen, ermöglichen den Erfolg von *A. fumigatus*, sondern auch dessen effektive Verbreitungsform. Sporen der Gattung *Aspergillus* zählen mit geschätzten Werten von 1-100 Sporen pro m³, zu den vorherrschenden pilzlichen Strukturen in der Luft (Latge, 1999). Dabei erfolgt die Verteilung sowohl über kurze als auch über lange Distanzen. In Abhängigkeit von der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, aber auch von Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeitsgehalt und pH-Wert, beginnt die Spore auszukeimen. Dieser Prozess, der von zahlreichen Rezeptoren und Signalwegen kontrolliert wird, beginnt mit der Wahrnehmung verschiedener essentieller Nährstoffe wie Zucker, Salze und Aminosäuren durch die Spore. Ist die Auskeimung ausgelöst, schwellen die Sporen an und eine Reihe metabolischer Aktivitäten werden in Gang gesetzt, wie beispielsweise der

Umbau der Zellwand, die Proteinbiosynthese und der Abbau von Trehalose, einem kompatiblen Solut, das zur Sicherung des Überlebens über längere Zeiträume in großen Mengen in den Sporen eingelagert wird. (Ni and Yu, 2007). Während des Anschwellens wächst die Spore isotrop. Nach einigen Stunden bildet sich ein Keimschlauch und polares Wachstum in Richtung des terminalen Bereichs setzt ein. Durch Verzweigung der einzelnen Hyphen entsteht ein dichtes Geflecht, das als Myzel bezeichnet wird. Bei Luftkontakt des Myzels kommt es zur Bildung der Konidienträger. Dabei entsteht aus einer sogenannten Fußzelle ein Konidiophor, an dessen Ende das Konidiophorenvesikel entsteht. Auf dieser Struktur sitzen die Konidien bildenden Phialiden auf, längliche Ausstülpungen, die die Konidien basipetal in lange Ketten abschnüren (Raper and Fenell, 1965). Nach der Reifung der abgeschnürten Konidien können diese durch die Luft verbreitet werden und ein neuer Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt (Abb. 1).

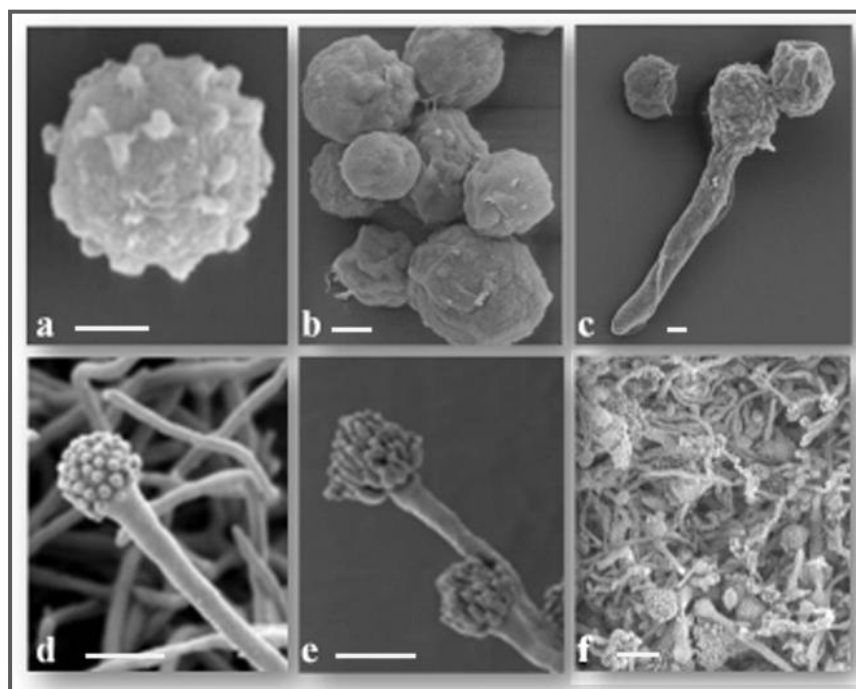


Abb.1: Elektronenmikroskopische Darstellung der verschiedenen Wachstumsstadien von *A. fumigatus*

a ruhende Konidie; **b** aktivierte Konidien verschiedener Größen; **c** auskeimende Konidie (Keimling); **d** Myzel mit Konidiophor; **e** Konidiophor; **f** Myzelteppich mit Konidiophoren. Der Maßstab in a-c entspricht 1 µm, in d-f 10 µm. (Quelle: M. Rohde, F. Ebel).

1.1.3 Medizinische Bedeutung

Menschen atmen täglich 10.000-15.000 Liter Luft ein und stehen dadurch in ständigem Kontakt mit Konidien des Schimmelpilzes *A. fumigatus* (Abad *et al.*, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass ein Mensch täglich mehrere hundert Konidien einatmet (Latge, 1999). Trotz der Allgegenwärtigkeit und der quasi ständigen Exposition gegenüber *A. fumigatus* über den Kontakt mit Erde oder konidienhaltiger Raumluft ist es umso erstaunlicher, dass immunkompetente Menschen relativ selten durch diesen Schimmelpilz ausgelöste Erkrankungen entwickeln. Sporen sind aufgrund ihrer geringen Größe (2-3 µm im Durchmesser) in der Lage, die natürliche Barriere des Flimmerepithels während der Inhalation zu überwinden und so bis in die Lungenalveolen vorzudringen. Dort angelangt, keimen diese aus und beginnen zu wachsen (Latge, 1999). Die Atemwege stellen somit die Haupteintrittspforte für den Schimmelpilz in den menschlichen Körper dar. Die genannte geringe Größe der Sporen, die es ihnen ermöglicht bis in die Lungenalveolen vorzudringen, sowie die Thermotoleranz von *A. fumigatus*, stellen nur zwei Komponenten dar, die es diesem Schimmelpilz ermöglichen, sich gegenüber anderen Arten seiner Gattung wie beispielsweise *A. flavus* und *niger* als der führende pathogene Schimmelpilz weltweit zu behaupten. Daneben sind die hohe Resistenz gegen oxidativen Stress, die beachtliche Wachstumsrate sowie die Anpassung an verschiedenste Nährstoffangebote zu nennen (Abad *et al.*, 2010). Konidien, die in gesunden Personen der mukoziliären Säuberung entgehen konnten, sehen sich einer Konfrontation mit verschiedensten Zelltypen gegenübergestellt. Dabei sind vor allem zwei Zelltypen an der zellulären Abwehr beteiligt: alveolare Makrophagen, deren Aufgabe in der Phagozytose und folglich dem Zerstören der Konidien besteht sowie der Initiierung einer proinflammatorischen Antwort, die wiederum zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt. Konidien, die der Phagozytose durch Makrophagen entkommen konnten und folglich fähig waren auszukeimen, werden zum Angriffspunkt eindringender neutrophiler Granulozyten, welche in der Lage sind auch Hyphen zu zerstören (Dagenais and Keller, 2009).

Bei immunkompetenten Menschen bewirkt *A. fumigatus* meist Probleme in Form von Hypersensitivitätsreaktionen und verursacht so z.B. eine exogen allergische Alveolitis. Patienten ohne voll funktionsfähige Immunabwehr hingegen sind gefährdet, lokale oder systemisch invasive Infektionen durch den sich vermehrenden Erreger selbst zu entwickeln (Dixon *et al.*, 1996a). Die Möglichkeit schwerwiegende, von *A. fumigatus* induzierte Krankheiten zu entwickeln, ist somit zwangsläufig mit dem Zustand des menschlichen

Immunsystems verbunden. Die in der modernen Medizin immer häufiger therapeutisch eingesetzte Immunsuppression hat dazu geführt, dass invasive Infektionen durch den früher als schwach pathogen geltenden Erreger *A. fumigatus* immer mehr zu einer oft letalen Bedrohung werden. Neben einer angeborenen oder erworbenen Immundefizienz durch z.B. Neutropenie, chronischer Granulomatose, Leukämie oder AIDS spielt die therapeutische Immunsuppression bei vielen Erkrankungen oder medizinischen Eingriffen eine immer größere Rolle. Beispiele hierfür sind Langzeittherapien mit Immunsuppressiva z.B. nach Transplantationen oder bei Autoimmunerkrankungen, hochdosierte Glucocorticoid-Behandlungen oder neue, intensive Chemotherapieverfahren, die bei unterschiedlichen Krebserkrankungen wie Tumoren, Lymphomen, Myelomen und Leukämie eingesetzt werden (Dagenais and Keller, 2009).

1.1.4 Ein Pilz - drei Krankheiten: *Aspergillus fumigatus* und Aspergillosen

Der Begriff Aspergillosen bezeichnet Mykosen, die ausschließlich durch die Gattung *Aspergillus* verursacht werden. Von den ca. 200 unterschiedlichen *Aspergillus*-Arten werden nur um die 40 als humanpathogen eingestuft. *A. fumigatus* verursacht dabei 90% aller Invasiven Aspergillosen (Denning *et al.*, 1998). Die Krankheitsbilder der Aspergillosen können nach Latge (1999) aufgrund ihres Infektionsweges in respiratorische und nicht-respiratorische Aspergillosen unterschieden werden. Nicht-respiratorische Aspergillosen betreffen beispielsweise die Infektion des Auges, der Haut oder des Gastrointestinaltrakts. Sie können sowohl bei immungeschwächten als auch seltener bei immunkompetenten Menschen auftreten, sind dabei aber als lokal begrenzte Mykose des betroffenen Gewebes nicht lebensbedrohlich. Die Krankheitsbilder der respiratorischen Aspergillose lassen sich nach Infektionsort, Ausmaß und Art des Pilzwachstums sowie dem Immunstatus des betroffenen Patienten in die Allergisch Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), das Aspergillom und die Invasive Aspergillose (IA) unterteilen (Abb. 2).

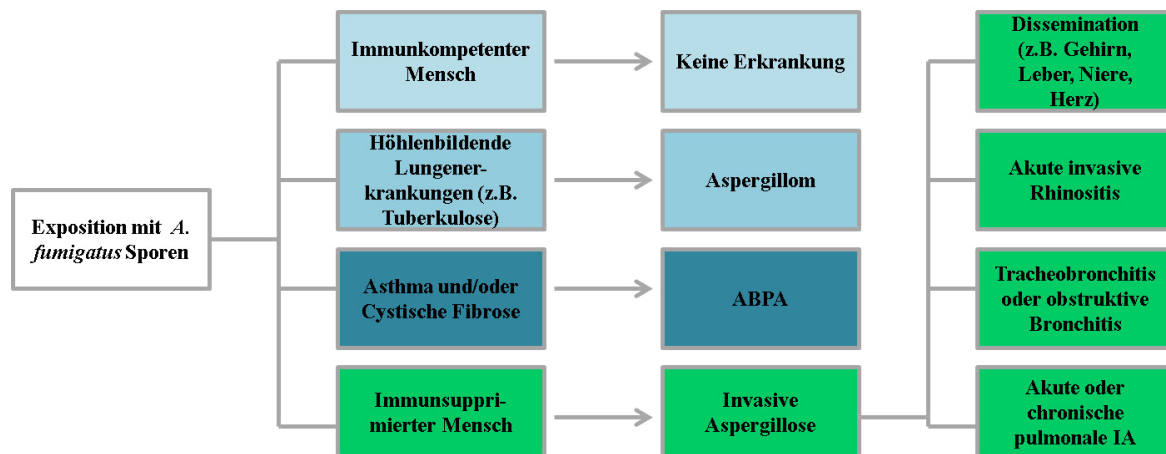


Abb. 2 Mögliche von *A. fumigatus* verursachte Erkrankungen

Eine Inhalation von *A. fumigatus*-Konidien kann, abhängig vom vorherigen Gesundheitszustand des Patienten, zu verschiedenen Erkrankungen führen – dem Aspergillom, der Allergisch Bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) und der Invasiven Aspergillose (IA). Beim Aspergillom handelt es sich um eine lokal begrenzte Mykose, die in bereits bestehenden Lungenhöhlräumen entsteht. Hohlraumbildende, pulmonale Vorerkrankungen, wie Tuberkulose oder cystische Fibrose begünstigen dabei die Entstehung eines Aspergilloms. Die ABPA kommt häufig bei Patienten mit bestehendem Asthma und einer cystischen Fibrose vor. Sie äußert sich in einer allergischen Reaktion auf inhalierte und auskeimende Konidien. Die schwerwiegendste, von *A. fumigatus* ausgelöste Erkrankung, stellt die Invasive Aspergillose dar, welche fast ausschließlich immunsupprimierte Patienten betrifft. Eine Invasive Aspergillose kann je nach Situation in vier Untergruppen unterteilt werden: die akute oder chronisch pulmonale Aspergillose, welche die am meisten verbreitete Form der IA darstellt; die Tracheobronchitis und obstruktive Bronchitis mit variierenden Invasionsgraden der Schleimhäute; die akute invasive Rhinosinusitis und die Dissemination des Erregers in Folge hämatogener Streuung in umliegende Organe (z.B. die Leber, Niere, das Herz oder Gehirn) oder Penetration der Hyphen in umliegendes Gewebe (modifiziert nach Bauer, 2010).

Die bronchopulmonale Aspergillose stellt eine der schwerwiegendsten durch die Gattung *Aspergillus* verursachten allergisch pulmonalen Erkrankungen dar. Das Krankheitsbild ähnelt dem einer klassischen Asthma-Erkrankung begleitet von einer Immunreaktion der T-Zellen gegen eingedrungene Pilzsporen (Latge 1999). Die ABPA kommt häufig bei Patienten mit bestehendem Asthma oder einer cystischen Fibrose vor (Knutsen *et al.*, 1992). Sie äußert sich in einer allergischen Reaktion auf inhalierte und auskeimende Konidien. Die allergische Reaktion äußert sich je nach Stadium klinisch wie Bronchialasthma mit chronischen Lungeninfiltrationen und ist oft schwer von einer bakteriellen Infektion zu differenzieren. In der Regel wird die Diagnose über die Eosinophilie im Blutbild und den erhöhten IgE- und IgG-Antikörpertiter gegen *Aspergillus*-Antigene gestellt (Chotirmall *et al.*, 2013).

Die zweite Form der Aspergillose ist das sogenannte Aspergillom oder auch „Pilzball“. Dabei handelt es sich um eine lokal begrenzte Mykose, die in bereits bestehenden

Lungenhohlräumen entsteht. Kavitätsbildende, pulmonale Vorerkrankungen, wie Tuberkulose oder cystische Fibrose, begünstigen die Besiedlung und damit die Bildung eines Aspergilloms. Nach Auskeimung der inhalierten Konidien kommt es zu einem kugelförmigen Hyphenwachstum, das sich auf die zur Verfügung stehende Fläche des vorhandenen Hohlraums beschränkt. Das Aspergillom ist in der Regel asymptomatisch, jedoch kann es in Ausnahmefällen zu lebensbedrohlichen Hämoptysen kommen, die durch Invasion des Erregers in die bronchialen Arterien, entstehen können (Chotirmall *et al.*, 2013). Die Diagnose ist daher meist ein radiologischer Zufallsbefund in Form einer sphärischen Ansammlung von Pilzhyphen auf Röntgenaufnahmen der Brust (Stevens *et al.*, 2000). Wegen der guten räumlichen Abgrenzung zum restlichen Gewebe kann ein Aspergillom chirurgisch entfernt werden. Ein weiteres vielversprechendes Verfahren stellt auch die direkte, CT-geführte Einschleusung von Antimykotika wie beispielsweise Amphotericin B in den betroffenen Bereich dar, welche zu einer vollständigen Auflösung des Aspergilloms führen kann (Giron *et al.*, 1998).

Die invasive Aspergillose ist die schwerwiegendste durch *A. fumigatus* ausgelöste Erkrankung, verbunden mit einer Letalitätsrate von über 50% bei Knochenmarkstransplantationen und bis zu 90% bei Leukämiepatienten (Denning *et al.*, 1998; Latge, 1999; Lin *et al.*, 2001). Die hohe Mortalitätsrate ist eng mit dem geschwächten Immunsystem des betroffenen Patienten verbunden, jedoch in gleichem Maße auch mit der Virulenz des Erregers selbst und dem Defizit in der Erstellung einer frühzeitigen Diagnose (Abad *et al.*, 2010). Zur Risikogruppe einer invasiven Aspergillose zählen vor allem immungeschwächte Patienten in Transplantationszentren sowie hämatologischen Abteilungen mit länger andauernder Neutropenie und pulmonalen Vorerkrankungen (Latge 1999).

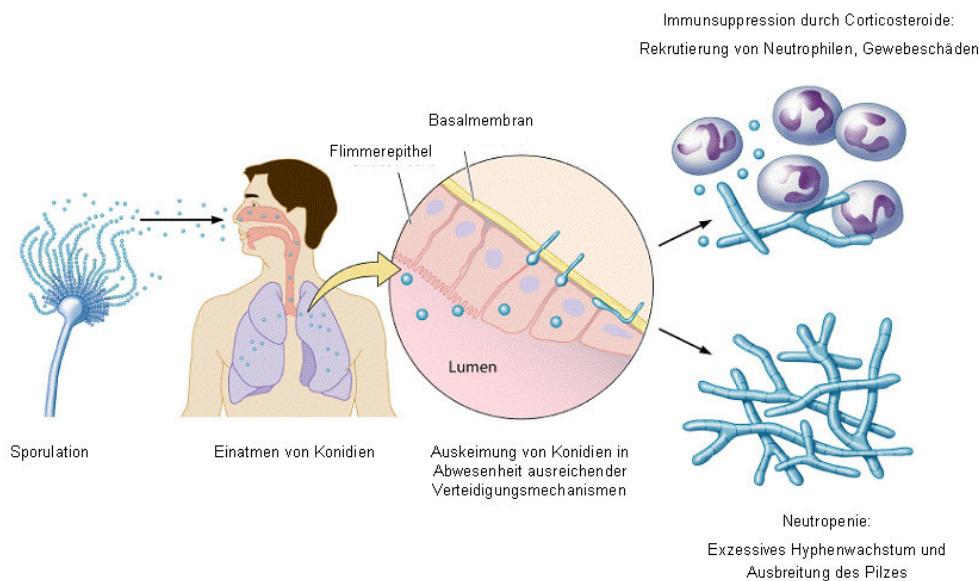


Abb. 3 Entwicklung einer invasiven Aspergillose in Abhängigkeit von der Art der Immunsuppression

Luftverbreitete, eingeatmete Konidien können bei mangelnder Abwehr auskeimen und das Lungengewebe infiltrieren. Im weiteren Verlauf kommt es im Falle einer Neutropenie zu exzessivem Pilzwachstum mit Verbreitung auf andere Organe oder aber, bei Corticosteroid-induzierter Immunsuppression zu starker Rekrutierung von Neutrophilen und daraus folgenden Gewebeschäden (modifiziert nach Dagenais and Keller, 2009).

Während bei Neutropenie-Patienten aufgrund des Mangels an Neutrophilen das Entzündungslevel sehr gering ausfällt und es dadurch zu Angioinvasionen und der Verbreitung des Pilzes über den Blutkreislauf auf andere Organe kommen kann, ist die Infektion bei Patienten, die aufgrund einer Corticosteroid-Therapie immunsupprimiert sind, durch limitiertes Pilzwachstum mit starkem Neutrophilen-Influx, hohem Entzündungslevel und Gewebeschäden gekennzeichnet. Folglich sterben Neutropenie-Patienten, die an einer *A. fumigatus*-Infektion leiden, häufig an unkontrolliertem Wachstum des Pilzes, wohingegen bei Patienten mit Corticosteroid-Therapie eine überschießende Entzündungsreaktion mit daraus folgenden Gewebeschäden zum Tod führt (Abb.3) (Dagenais and Keller, 2009).

Ein weiteres großes Problem stellt nach wie vor die Erstellung einer frühzeitigen und eindeutigen Diagnose der IA dar. Es existiert derzeit kein Nachweisverfahren, das universell anwendbar und gleichzeitig ausreichend spezifisch und sensitiv genug ist. Der Nachweis einer invasiven Aspergillose erfolgt aus diesem Grund auf Basis unterschiedlich kombinierter Nachweisverfahren (Latge, 1999; De Pauw B *et al.*, 2008). Da es vor allem bei neutropenischen Patienten zu einer schnellen invasiven Ausbreitung der Aspergillose kommt,

die innerhalb kurzer Zeit tödlich verläuft, ist eine frühzeitige Diagnose und die damit verbundene Therapie unerlässlich. Die Diagnostik der IA kann zum einen in den traditionellen „Goldstandard“, der den mikrobiologischen, histologischen und radiologischen Nachweis enthält und zum anderen in die molekularbiologische, nicht-kultivierungsabhängige Diagnostik unterteilt werden (Denning, 2006). Die traditionelle, kultivierungsabhängige Diagnostik basiert dabei auf der Entnahme von Körperflüssigkeiten (Sputum oder Bronchialsekret) oder Lungengewebe und deren mikrobiologischen bzw. histopathologischen Untersuchung auf Erreger. Der Nachteil des mikrobiologischen Nachweises besteht in der zeitintensiven und kontaminationsanfälligen Kultivierung, der nicht ausreichenden Sensitivität und der schwierigen Differenzierung gegenüber anderen Mykosen (Ostrosky-Zeichner, 2012). Die histologischen Nachweisverfahren sind aufwendig und basieren sowohl auf einer morphologischen Identifizierung des Pilzes als auch auf unterschiedlichen Färbemethoden der Pilzhyphen. Die Färbemethoden sind jedoch nicht artspezifisch, was eine Differenzialdiagnose erschwert. Ein Nachweis *Aspergillus*-spezifischer Antikörper ist für die Frühdiagnostik der IA nur bedingt geeignet, da aufgrund der Immunsuppression nur in wenigen Patienten spezifische Antikörper nachgewiesen werden können (Thompson and Petterson, 2008). Für den Nachweis von Pilzantigenen werden gegenwärtig die Polysaccharide (1,3)- β -D-Glucan und Galactomannan verwendet. Sie sind Bestandteile der pilzlichen Zellwand und werden während des Wachstums bzw. bei der invasiven Ausbreitung ins umgebende Milieu abgegeben, so dass sie frühzeitig in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können, Tage bevor klinische Symptome auftreten können (Marr *et al.*, 2004). Obwohl der Galactomannan Test generell eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigt, kann es jedoch auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen, beispielsweise ausgelöst durch die Verwendung von β -Lactam Antibiotika oder durch andere invasiven Mykosen, wie einer Histoplasmose, einer Blastomykose oder einer durch *Penicillium* verursachten Mykose (Ostrosky-Zeichner, 2012). Anders als Galactomannan, welches relativ spezifisch für die Gattung *Aspergillus* ist, stellt das (1,3)- β -Glucan ein Polysaccharid dar, welches ein Bestandteil der Zellwand der meisten pilzlichen Pathogene ist. Ausnahmen stellen Arten von *Mucor* sowie *Cryptococcus* dar (Barton, 2013). Da das (1,3)- β -Glucan jedoch nicht in Säugetieren, Bakterien oder Viren nachweisbar ist, ist der Nachweis dieses Polysaccharids in Patientenseren ein deutlicher Hinweis auf eine invasive pilzliche Infektion (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Der Nachweis von spezifischer *Aspergillus*-DNA mittels PCR stellt sowohl die neueste als auch die sensitivste Methode zum Nachweis einer IA dar. Allgemein wird angenommen, dass anders als Galactomannan und (1,3)- β -D-Glucan, DNA aber erst in einer sehr späten

Wachstumsphase, bei beginnender Autolyse der hyphalen Zellen, nachweisbar ist (Barton, 2013). Morton und Mitarbeiter (2010) konnten jedoch unter Verwendung eines sensitiveren PCR-Ansatzes zeigen, dass die Freisetzung von DNA bereits während der exponentiellen Wachstumsphase stattfindet. Die Fehlerquellen des PCR-Nachweises liegen in der Variation der DNA-Qualität und -Quantität sowie in der Kontamination des DNA-Ausgangsmaterials, wodurch die PCR-Ergebnisse kaum reproduzierbar werden. Könnten diese Probleme gelöst werden und ein geeigneter PCR-Test standardisiert werden, würde sich dieser als nützlicher Zusatz zu den bereits bestehenden Testsystemen erweisen.

Aufgrund mangelnder eindeutiger Nachweisverfahren erfolgt die Behandlung der IA mit Antimykotika oft prophylaktisch, so dass bereits bei Verdacht auf eine IA mit der Therapie begonnen wird (Latge, 1999). Zu den Antimykotika, die bei einer invasiven Aspergillose eingesetzt werden können, zählen das Triazol Voriconazol, welches durch Hemmung des Cytochrom P450 Enzyms die Bildung von Ergosterol in der Zellmembran von Pilzen inhibiert und so zu einer Störung der Zellmembran mit folgender Hemmung des Zellwachstums führt und letztlich im Zelltod endet. Das bis vor kurzem als Antimykotikum der Wahl eingesetzte Amphotericin B ist ein Polyen, welches durch Bindung an Ergosterol zur Bildung von Ionen-Kanälen führt, welche wiederum die Permeabilität der Zellmembran erhöhen, was letztlich zum Zelltod führt (Thompson and Patterson, 2008). Eine Ausweichmöglichkeit bei Patienten, die auf diese Standard-Antimykotika nicht ansprechen oder diese aufgrund ihrer meist starken Nebenwirkungen (Thompson and Patterson, 2008) nicht vertragen, stellt die besonders nebenwirkungsarme Gruppe der Echinocandine (Caspofungin) dar. Diese Pharmazeutika hemmen die Synthese des (1,3)- β -D-Glucans, einem Zellwandbestandteil vieler pathogener Pilze (Zmeili *et al.*, 2007).

Eine weitere Therapiemöglichkeit, die nur für ein begrenztes Patientenkollektiv in Betracht gezogen werden kann, ist die chirurgische Intervention. Die Teilresektion der Lunge wird vor allem bei Patienten mit massiver Hämoptyse oder Befall der großen pulmonalen Gefäße durchgeführt (Latge, 1999).

1.2 Das Myzel filamentöser Pilze - Interzelluläre Kommunikation

Für den Erfolg von Pilzen als humanpathogene Erreger ist das Vermögen, invasiv in menschliches Gewebe vordringen zu können, von besonderer Bedeutung.

Generell kann das Wachstum von Pilzen in einzelliges, hefeartiges und filamentöses Wachstum unterschieden werden. Einzelliges Wachstum findet man beispielsweise bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*. Hefezellen vermehren sich durch Knospung. Dabei werden Tochterzellen nach erfolgter Mitose von ihren Mutterzellen durch Zytokinese und Septenbildung abgetrennt. Vielzelliges, filamentöses Wachstum wie bei den Ascomyceten ist im Gegensatz dazu durch schlauchförmig elongierte und aneinandergereihte Zellen gekennzeichnet, die durch perforierte Septen voneinander getrennt sind. Die so entstehenden Hyphen bilden ein sich verzweigendes Myzel, welches durch die gemeinsame äußere Zellwand zu einer Einheit verwächst. Kernteilungen sowie die Entstehung neuer Zellen sind dabei auf den apikalen Bereich einer Hyphe beschränkt, um eine gerichtete Fortbewegung der Hyphenspitze zu gewährleisten. Das apikale Wachstum wird dabei durch zwei Prozesse gesteuert – den inneren Druck, der die treibende Kraft in Richtung Apex liefert sowie eine erhöhte Zellwanddynamik im Bereich des Apex, der in einem Bereich erhöhter Plastizität resultiert. Wachsende Hyphen besitzen die Fähigkeit sich auch lateral zu verzweigen. Dies erlaubt ihnen ein komplexes Myzel-Netzwerk auszubilden, welches befähigt ist, als Einheit seine Umgebung zu erkunden. Das Myzel erlaubt dabei mit Hilfe der zentral gelegenen septalen Pore eine interzelluläre Kommunikation sowie den Transport und Austausch von Organellen.

Vielzellige Organismen umfassen Zellen, die mit benachbarten Zellen mittels einer Vielzahl von Verbindungen in engem Kontakt stehen. Wichtige Verbindungsstrukturen der Animalia stellen dabei *Gap junctions* und *Tunneling Nanotubes* dar. *Gap junctions* mit einem Porendurchmesser von 1,6 bis 3 nm verbinden benachbarte Zellen miteinander (Sosinsky und Nicholson, 2005). Die in den letzten Jahren bekannt gewordenen Tunnel ausbildenden *Tunneling Nanotubes* sind in der Lage, Zellen auch über weite Strecken miteinander zu verbinden (Rustomet *et al.*, 2004). Pflanzliche Zellen kommunizieren über sogenannte Plasmodesmen, kleine Nanokanäle von 1,5 bis 2 nm Größe, die das Zytoplasma benachbarter pflanzlicher Zellen über eine Art Brücke miteinander verbinden (Lucas *et al.*, 2009).

Das Cytoplasma benachbarter Zellen filamentöser Pilze ist über eine zentrale Pore, 25-500 nm im Durchmesser, in den Septen miteinander verbunden. Der dadurch mögliche cytoplasmatische Austausch zwischen benachbarten Hyphenzellen erlaubt es sub-apikalen Zellen, durch den Transport von Nährstoffen und Enzymen in Richtung Apex, effektiv am Wachstum der Hyphenspitze beteiligt zu sein. Die pilzliche Kolonie stellt damit eine Einheit dar, deren Cytoplasma sich durch ein wachsendes und miteinander verbundenes System

bewegt. Dieses Netzwerk wird durchsetzt von Septen, deren Aufgabe in der Kontrolle des Austausches von Nährstoffen, Molekülen und Organellen liegt. Aufgrund des gerichteten Wachstums der Hyphen, bei dem sich die Hyphenspitzen auf die Nährstoffquelle zubewegen, variiert auch die Umgebung einzelner Teilbereiche eines Myzels. Distal gelegene Segmente können sich so in einer Umgebung befinden, deren Nährstoffangebot bereits erschöpft ist. Die Organisation filamentöser Pilze, als Einheit zu verwachsen, ermöglicht es so dem Organismus, seine Umgebung effizient zu erkunden und zu nutzen und dabei alle Bereiche der Hyphe mit den benötigten Nährstoffen zu versorgen. So vorteilhaft die Funktion als Einheit erscheint, birgt sie doch auch ein Risiko, da jede lokale Beschädigung einer einzelnen Hyphe eine Bedrohung für das gesamte Myzel darstellt. Das Septum, das benachbarte Zellen voneinander abtrennt, muss daher in der Lage sein, trotz des hohen osmotischen Innendrucks, beschädigte Bereiche von intakten abtrennen zu können, um die Integrität des gesamten Myzels aufrecht zu halten.

1.3 Septen filamentöser Pilze

Höhere Pilze werden in vier Klassen unterteilt – Chytridiomyceten, Zygomyceten, Ascomyceten und Basidiomyceten. Obwohl bei niederen Pilzen Fortpflanzungsstrukturen von den vegetativen Zellen über Querwände abgetrennt werden können, sind diese im Bereich der vegetativen Hyphen generell unseptiert (Esser 1982).

Hyphen höherer Pilze wie Ascomyceten und Basidiomyceten besitzen immer Septen, welche wiederum generell Poren aufweisen. Die unseptierte Natur von Myzel früh divergierender Pilze lässt vermuten, dass das Septum keine Notwendigkeit bei der erfolgreichen Besiedelung von Substrat darstellt. Das Vorhandensein perforierter Septen scheint jedoch, verglichen mit Mitgliedern ursprünglicher Pilze, ein komplexeres multizelluläres Organisationsniveau zu ermöglichen. Basidiomyceten weisen Septen mit fassartigen Verdickungen auf, die entlang einer schmalen Pore verlaufen. Diese Pore wird als Dolipore bezeichnet und steht mit sogenannten *Septal Pore Caps* (SPC) in Verbindung, welche vermutlich am Verschluss der Pore, bei Bedrohung der Integrität der gesamten Hyphe, beteiligt sind (Jedd, 2011). Das Septum von Ascomyceten kann als einfache Scheibe mit einer zentralen Pore, 50 bis 500 nm im Durchmesser, beschrieben werden. Die Pore erlaubt dabei den stetigen Austausch von Zytoplasma und Organellen, wie Mitochondrien, Vakuolen und sogar Nuklei (Gull 1978).

Hyphen des dimorphen Pilzes *Candida albicans* weisen zwar Septen auf, jedoch erlauben diese aufgrund einer nur kleinen Öffnung von lediglich 25nm keinen Austausch von Organellen zwischen benachbarten Kompartimenten, sie halten allerdings die cytoplasmatische Kontinuität aufrecht (Gow *et al.*, 1980).

Hyphen von *N.crassa* weisen, verglichen mit Hyphen von *A. fumigatus*, einen enormen Durchmesser auf (Lew, 2005). Dies ist nicht weiter verwunderlich, bedenkt man, dass dieser filamentöse Pilz durch ein rapides Hyphenwachstum gekennzeichnet ist und folglich einen schnellen Cytoplasmafluss in Richtung des Apex gewährleisten muss. Demzufolge weisen auch die Poren von *N. crassa* einen Durchmesser auf, der den von *A. fumigatus* um das drei bis fünffache überragt (Managadze *et al.*, 2007). Eine Gegenüberstellung der Septen von *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* (als Vertreter der Gattung *Aspergillus*) und *Neurospora crassa*, ist Abbildung 4 zu entnehmen.

Candida albicans (Gow *et al.*,1980)



pore diameter: 25 nm

Aspergillus nidulans (Momany *et al.*,2002)



pore diameter: 100 nm

Neurospora crassa (Managadze *et al.*, 2007)



pore diameter: 300-500 nm

1000 nm

Abb.: 4: Vergleich der Septen in *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*.

Candida albicans weist generell keine Woronin Körper auf, was bei einem Porendurchmesser von lediglich 25 nm auch nicht notwendig erscheint. *Aspergillus nidulans* dagegen besitzt verglichen mit *Candida albicans* einen viermal größeren Porendurchmesser von 100nm, der einen stetigen Austausch von Cytoplasma und Organellen erlaubt. Um verletzte von intakten Kompartimenten abzutrennen, besitzen Hyphen der Gattung *Aspergillus* Woronin Körper. Auch *Neurospora crassa* besitzt Woronin Körper (Wb), die, wie an diesem Beispiel gezeigt, bei Beschädigung der Hyphe, die septale Pore verschließen. *N. crassa* weist Poren mit einem Durchmesser von 300 bis 500 nm auf. Jedoch überschreitet auch der Hyphen-Durchmesser den von *Aspergillus* um das etwa dreifache.

Während die Bildung von Septen in Hefen zur Zelltrennung führt, haben diese Zwischenwände bei filamentösen Pilzen eine weitaus wichtigere Rolle - sie begrenzen das Ausmaß an mechanischer Zerstörung und erhalten so die Integrität der Hyphe.

Die Bildung des ersten Septums einer jeden Hyphe erfordert eine bestimmte Zellgröße. Anders als bei Hefezellen ereignen sich in dieser Zeit mehrere Zellkernteilungen ohne stattfindende Zytokinese (Harris, 2001). In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass während der Germination einer einzelligen Konidie, zwei bis drei Mitosezyklen in Abwesenheit einer Zytokinese stattfinden. Ein Septum wird dabei für gewöhnlich nach der dritten erfolgten Kernteilung gebildet (8-Kern-Stadium). Dies stellt einen Kontrollmechanismus dar, der verhindert, dass ein Septum in einem verfrühten Teilungsstadium entstehen kann (Momany *et al.*, 1997). Ist die erforderliche Zellgröße erreicht, wird die Bildung des ersten Septums mit Abschluss des nächsten Mitosezyklus ausgelöst. Dies geschieht für gewöhnlich unmittelbar an der Auskeimungsstelle der Konidie zum Keimling (Harris *et al.* 1994). Als Folge der Entstehung des ersten Septums kommt es im Bereich der Hyphenspitze im Verlauf des apikalen Wachstums der Hyphe zu zahlreichen Kernteilungen, welche wiederum eine Welle von Septierungen auslösen (Momany *et al.*, 1997).

Aufgrund der Ausbildung eines kontraktiven Aktin-Rings (CAR) sowie der mitotischen Koordination der Septenentstehung, kann der Bildung eines Septums in filamentösen Pilzen eine starke Ähnlichkeit zur Zytokinese von tierischen Zellen zugesprochen werden (Balasubramanian *et al.*, 2004). In Analogie zu den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* liefert dieser Aktin-Ring einen Orientierungspunkt für die Ablagerung von Zellwand-Material. Der Aktin-Ring bildet sich vor dem Erscheinen des Septums und zieht sich zeitgleich mit der Ablagerung von septalem Zellwandmaterial zusammen. Sowohl die Bildung als auch die Kontraktion des Rings sind dabei von der Anwesenheit intakter Mikrotubuli abhängig (Harris, 2001). Verschiedene Komponenten, die neben dem kontraktiven Aktin-Ring in die Septenbildung involviert sind, konnten durch genetische Analysen von *Aspergillus nidulans* identifiziert werden – darunter das sogenannte *Septation Initiation Network*, kurz SIN, Septine sowie Formine (Si *et al.*, 2010). Das SIN stellt dabei eine Kaskade dreier Proteinkinasen dar, die mithilfe einer kleinen GTPase aktiviert wird (Krapp and Simanis 2008). Die verantwortlichen Kinasen des *Septation Initiation Networks* sind hierbei hierarchisch arrangiert in SepH > SepL > SidB. Funktionelle Analysen von SepH und SidB konnten zeigen, dass das SIN für den Aufbau des Aktin-Rings benötigt wird (Bruno *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006). Septine stellen eine konservierte Familie von Proteinen dar, die im gesamten

Reich der Eukaryonten, mit Ausnahme der Pflanzen, vorkommen. Im Verlauf der Septenbildung bilden Septine Ring-ähnliche Strukturen an der Innenseite der Plasmamembran aus (Spiliotis and Gladfelter, 2012), welche als Gerüst für weitere benötigte Proteine fungieren. Septine kontrollieren somit den Aufbau sowie die Aufrechterhaltung spezieller Strukturen, die den Verlauf der Septenbildung vorantreiben. Das wohl am stärksten exprimierte Septin in *A. nidulans* ist AspB. Dieses erscheint anfänglich als einzelner nicht zusammengezogener Ring, trennt sich im weiteren Verlauf jedoch, parallel mit der Kontraktion des Aktin-Rings sowie der Anlagerung von Zellwandmaterial, in einen Doppelring auf, der das Septum umgibt (Westfall and Momany, 2002). Im weiteren Verlauf bleibt der apikal gelegene AspB Ring bestehen, während der basal gelegene verloren geht. Eine Deletion des *aspB* Gens hat eine verzögerte Septierung zur Folge. Diese Beobachtung zeigt, dass AspB eine wichtige Rolle im Septierungsprozess zugeschrieben werden kann, jedoch stellt dieses Protein keine essentielle Komponente dar (Harris, 2001). In *S. cerevisiae* und *S. pombe* werden Formine wie das SepA, durch eine Rho GTPase aktiviert (Martin *et al.*, 2007). Ein vielversprechender Kandidat für die Aktivierung von SepA könnte die GTPase Rho4 darstellen. Rho4 wird ausschließlich in filamentösen Pilzen gefunden. In *N. crassa* stellt diese GTPase einen dynamischen Bestandteil des kontraktilen Aktin-Rings, CAR, dar. Die Abwesenheit von Rho4 verhindert dabei die Bildung des besagten Rings (Rasmussen and Glass, 2005) und im Folgenden die Ausbildung eines Septums (Dichtl *et al.*, 2012). Harris und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in *A. nidulans* das Zusammenspiel aus den GTPasen Bud3 und Rho4 für den Aufbau von CAR und die Rekrutierung von Forminen an den benötigten Einsatzort, verantwortlich sind. Die Anwesenheit einer Rho-GEF Domäne in AnBud3 lässt dabei vermuten, dass dessen Rolle während der Septenbildung in einer lokalen Aktivierung der Rho GTPase Rho4 durch Förderung eines GDP-GTP Austausches, liegt. Aktiviertes Rho4 führt daraufhin zu einer gerichteten Rekrutierung von SepA und damit zum Aufbau des kontraktilen Aktin-Rings (Si *et al.*, 2010). Der Verlust von einem der beiden Proteine führt dabei jeweils zum vollständigen Ausbleiben der Septierung. Durch das Fehlen von *bud3* und das folgende Ausbleiben der Aktivierung von Rho4, kann das Formin SepA, welches für die Bildung von CAR verantwortlich ist, nicht mehr an den Ort der Septenbildung rekrutiert werden (Si *et al.*, 2010). Neben Bud3 konnte in *N. crassa* einer weiteren GTPase Bedeutung zugesprochen werden. Das dem Anillin verwandte Bud4 spielt neben der wichtigen Rekrutierung von Bud3 und der folgenden Aktivierung von Rho4 eine entscheidende Rolle für die Septenentstehung. Bud3 markiert den zukünftigen Bereich der

Entstehung eines Septums. Der erste Schritt in diesem Prozess stellt somit die Erscheinung eines kortikalen Rings des Bud3 Proteins, dar (Justa-Schuch *et al.*, 2010). Dem Formin SepA wird eine Aufgabe in der korrekten Anlagerung des Aktin-Rings am Ort der Septenbildung, zugesprochen. Experimente mit einem SepA-GFP Fusionsprotein konnten zeigen, dass SepA am Ort der stattfindenden Septenbildung anfänglich in Form eines kortikalen Punktes erscheint. Daraufhin bildet das genannte Formin einen Ring, welcher mit Aktin kolokalisiert und sich letztlich nach Ablagerung des Zellwandmaterials zusammenzieht. Beobachtungen, dass SepA-Ringe in Cytochalasin A-behandelten Hyphen zerfallen, bekräftigen die Annahme, dass die Entstehung dieser Ringe die Anwesenheit eines intakten Aktin-Rings erfordern (Harris, 2001). Abbildung 5 zeigt ein vereinfachtes Schema der während der Septenbildung stattfindenden Prozesse.

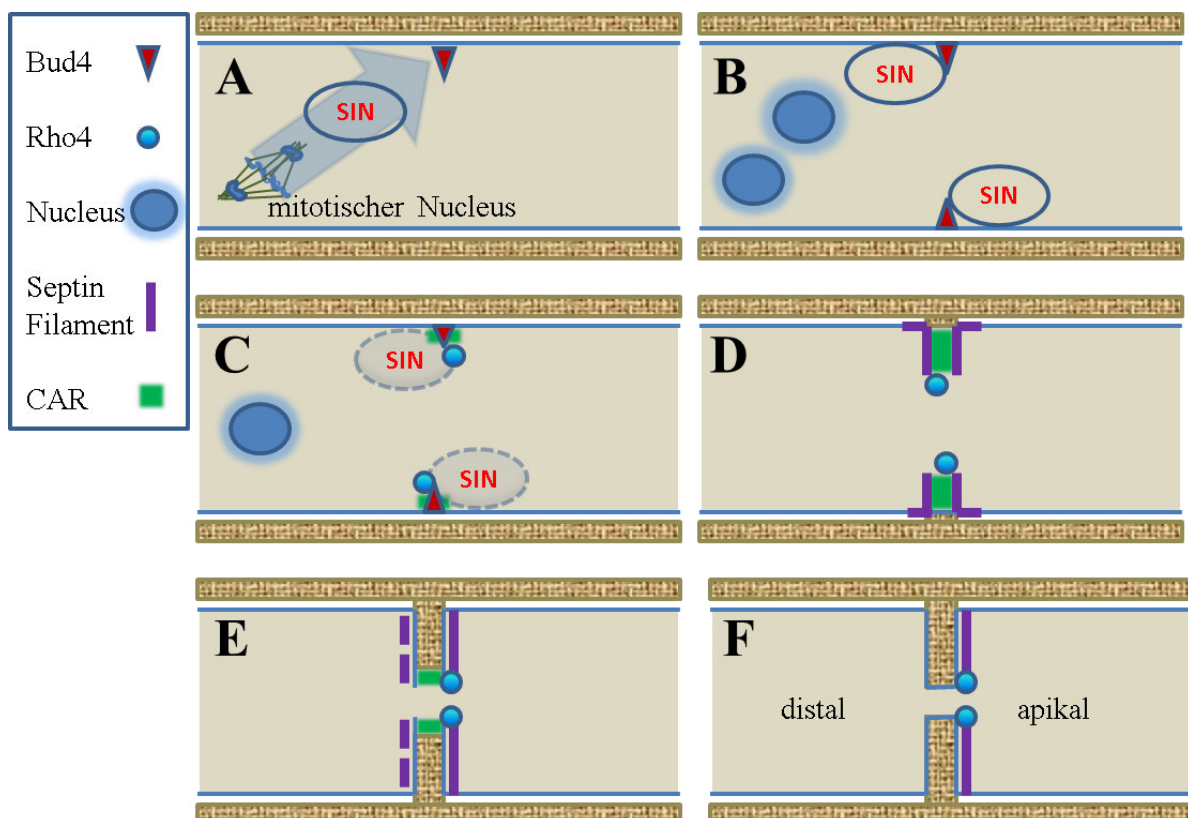


Abb 5.: Vereinfachtes schematisches Modell der stattfindenden Prozesse während der Septenbildung in *Aspergillus*.

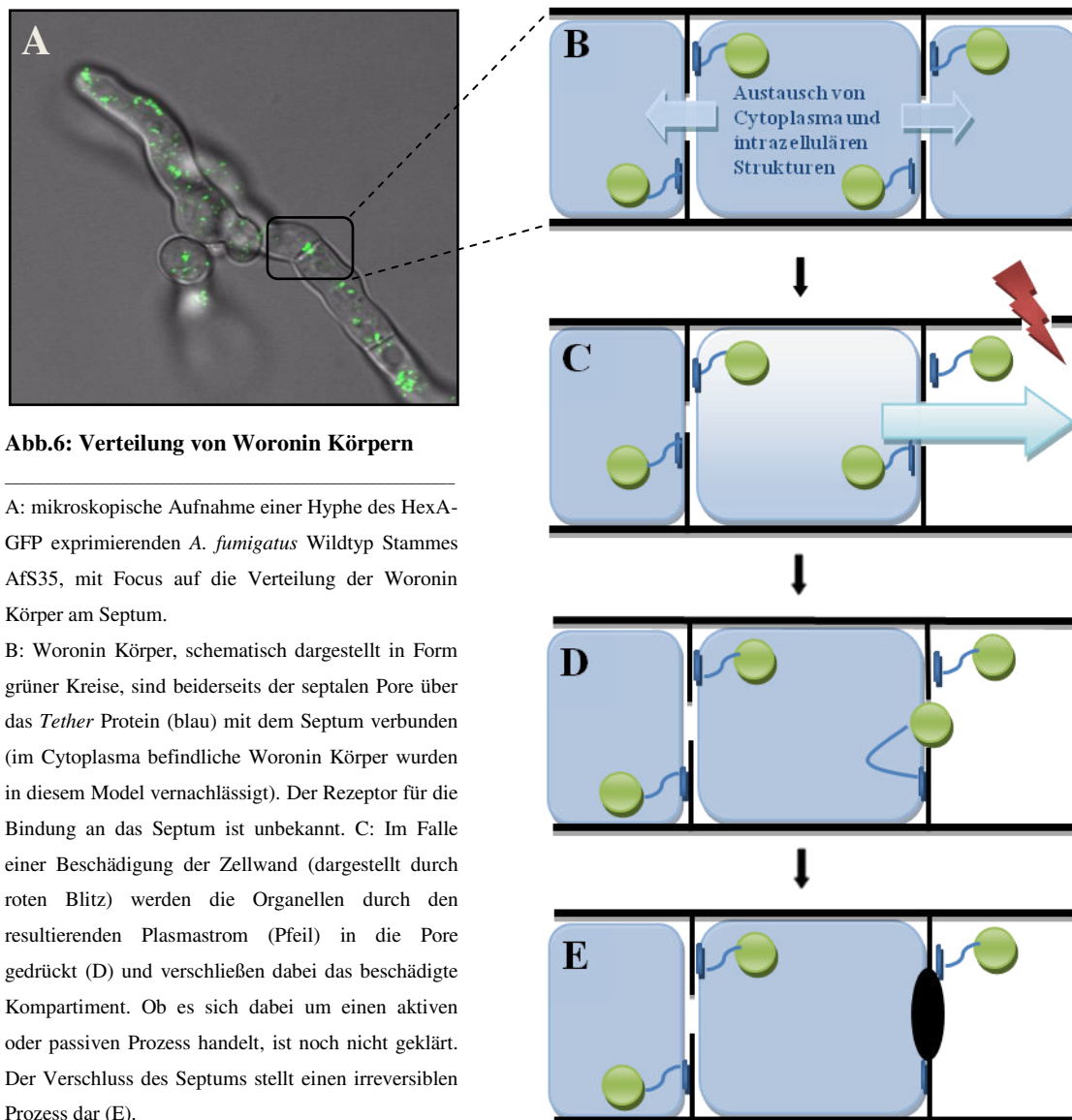
Bild A: Aktivierung des *Septation Initiation Network* (SIN). Bild B: Das Protein Bud4 definiert den Bereich der späteren Septenbildung. Bild C: Bud 4 rekrutiert die kleine GTPase Rho4, welche die Bildung des kontraktilen Aktin-Rings (CAR) initiiert. Bild D: Der Aktin-Ring zieht

sich zusammen und führt zur Bildung eines Aktin Doppel-Rings. Bild E: Bei Erreichen der finalen Größe der septalen Pore geht der distal gelegene Aktin-Ring verloren. Bild F: Diverse Proteine wie beispielweise Rho4 bleiben auch nach Ausbildung der fertigen septalen Pore mit dieser assoziiert. (modifiziert nach Beck *et al.*, 2013a).

Die Organisation in septierte Hyphen liefert filamentösen Pilzen zweifellos erhebliche Vorteile, jedoch stellt die septale Pore auch einen Schwachpunkt dar. Die Struktur des Septums ist somit ein Kompromiss zwischen der Fähigkeit, einen Austausch zwischen benachbarten Kompartimenten zu ermöglichen, und einer denkbaren Bedrohung zu entgehen, die nach lokaler Schädigung die Integrität der gesamten Einheit in Frage stellt. Aufgrund des hohen internen osmotischen Drucks, können bereits kleinste Verletzungen verheerende Auswirkungen auf das gesamte Myzel haben. Um die Gefahr zu begrenzen, entwickelten filamentöse Pilze verschiedene Möglichkeiten die septale Pore zu schließen und damit einen übermäßigen Verlust von Cytoplasma zu vermeiden.

1.4 Woronin Körper filamentöser Pilze – Verschluss der septalen Pore

Die erste Beschreibung von Woronin Körpern erfolgte 1864 in *Ascobolus pulcherrimus* durch den russischen Mykologen Michael Strepanovitch Woronin. Dieser fand im Lichtmikroskop „kleine Körnchen, deren Umrisse immer viel schärfer und dunkler erschienen als bei den übrigen Plasmakörnchen; und dabei liegen in den meisten Fällen auf der einen Seite der Querwand zwei oder drei solcher Körnchen, während auf der anderen Seite sich bloß eines derselben befindet“ (Woronin 1864). 1933 wurden diese Organellen durch Buller bestätigt und nach ihrem Entdecker Woronin Körper genannt (Buller, 1933). Dickson lieferte 1963 die Beschreibung einer ersten Funktion für diese Organellen. Die Annahme, Woronin Körper würden zu einem Verschluss der Septen nach Beschädigung der Hyphe oder in alterndem Myzel führen, beruhten zunächst nur auf Mutmaßungen (Dickson, 1963). Bestätigt werden konnten diese Beobachtungen 1974 von Trinci und Collinge, die die Fähigkeit dieser Organellen, septale Poren als Konsequenz vorangegangener Beschädigung zu verschließen, in *Neurospora crassa* zeigen konnten. Der Verschluss des Septums gewährleistet die Aufrechterhaltung der Integrität der Hyphen und verhindert dabei den übermäßigen Verlust von Cytoplasma (Jedd and Chua, 2000; Markham, 1994; Tenney *et al.*, 2000). Eine schematische Darstellung des Porenverschlusses durch Woronin Körper bei Beschädigung der Hyphe ist Abbildung 6 zu entnehmen.



Die initiale Abdichtung der septalen Pore, ausgelöst durch eine Verletzung der Zellwand, folgt die Anlagerung von Zellwandmaterial, welche zu einer irreversiblen Abtrennung des intakten Kompartiments vom geschädigten Areal der Hyphe führt. In *N. crassa* wie auch *A. nidulans* konnte Spitzenwachstum an bzw. aus der verschlossenen Pore beobachtet werden. Dabei resultiert das neu beginnende Wachstum in der Bildung von intra-hyphalen Hyphen, welche anfänglich innerhalb des beschädigten, cytoplasmafreien Hyphen-Kompartiments wachsen (Jedd and Chua, 2000).

Woronin Körper haben sich als spezielle Anpassung an das Wachstumsverhalten myzelbildender Pilze entwickelt. So sind diese in der Hyphen-Form der dimorphen Pilze *Blastomyces dermatitidis* und *Histoplasma capsulatum*, jedoch nicht in der Hefe-Form

nachweisbar (Garrison *et al.*, 1970). Woronin Körper stellen folglich ein charakteristisches Merkmal der filamentösen Ascomyceten dar.

Biochemische Reinigungen von Woronin Körpern in *N. crassa* identifizierten erstmals das Protein, HEX-1, benannt nach dessen **hex**agonalen Struktur, als Hauptbestandteil dieser Pilz-spezifischen Organellen (Jedd and Chua, 2000; Tenney *et al.*, 2000). Eine Deletion von *hex-1* und homologen Genen führte in verschiedenen Pilzen zum Verlust von Woronin Körpern, begleitet von einem massiven Cytoplasma-Verlust, nach Verletzung der Zellwand, wie auch zu verschiedensten sekundären Defekten, wie beispielsweise einer beeinträchtigten Sporulation (Jedd and Chua, 2000; Soundararajan *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2005).

In *Magnaporthe grisea* zeigt sich eine Bedeutung von Woronin Körpern für die Virulenz dieses pflanzenpathogenen Pilzes. Eine effektive Infektion einer Wirtspflanze durch *M. grisea* konnte in einer *mvp-1* Mutante (*hex-1* Ortholog) nicht mehr nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich ein Wachstumsdefekt unter Stickstoff-Mangelbedingungen, der zu einem verstärkten Absterben der Hyphen führte (Soundararajan *et al.*, 2004). Die Expression von HEX-1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche keine Woronin Körper aufweist, führt zur Bildung hexagonaler, intra-peroxisomaler Proteinzusammenschlüsse, die morphologisch Woronin Körpern ähnlich sind. Diese Erkenntnis unterstreicht, dass Hex ein Hauptbestandteil dieser Organellen ist (Jedd and Chua, 2000). Woronin Körper bilden sich nicht durch Teilung eines bereits existierenden Organells. Hex und seine Orthologe besitzen alle ein gemeinsames C-terminales peroxisomales *targeting signal* (PTS-1), welches für den Transport des Hex Proteins in die peroxisomale Matrix verantwortlich ist. Dort angelangt, findet die Entstehung sowie die Freisetzung reifer Woronin Körper, statt (Liu *et al.*, 2008).

In transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen Woronin Körper einen dichten osmophilen Kern auf, der von einer festen einzelnen Membran umgeben ist. Sie haben gewöhnlich einen Durchmesser von 0,1 – 0,75 µm (Collinge and Markham, 1985). Die Größe dieser Strukturen variiert je nach Spezies (Dhavale and Jedd, 2007). Dabei scheint die Größe, abhängig von der jeweiligen Art, etwas größer als der Durchmesser der septalen Pore zu sein (Markham and Collinge, 1987). Woronin Körper der meisten filamentösen Ascomyceten erscheinen rund, Organellen von *N. crassa* hingegen hexagonal (Dhavale and Jedd, 2007; Ng *et al.*, 2009). Der Unterschied in der Form und Größe dieser Strukturen, abhängig von der jeweiligen Spezies, könnte die Notwendigkeit unterschiedlicher Proteine zur Herstellung dieser Organellen suggerieren und dadurch eine Anpassung an die jeweilige Lebensweise zeigen. Nur wenige Woronin Körper von *A. fumigatus* lassen sich in unmittelbarer Nähe der

septalen Pore auffinden, jedoch zahlreich im Cytoplasma eines jeden hyphalen Kompartiments. Im Gegensatz dazu zeigen sich in *N. crassa* keine Woronin Körper nahe des Septums, sondern vielmehr assoziiert mit der Zellwand (Jedd and Chua, 2000). Laut einem von Jedd und Mitarbeitern aufgestellten Modell, entwickelte sich dieses spezifische Verteilungsmuster dieser Körper in *Neurospora* wie auch *Sordaria*, um den charakteristischen apikal gerichteten Cytoplasmafluss dieser Pilze, welcher diesen ein enorm schnelles Wachstum ermöglicht, aufrecht zu erhalten (Jedd, 2011; Ng *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass Woronin Körper der meisten filamentösen Ascomyceten, nahe dem Septum lokalisiert sind, lässt die Anwesenheit einer Struktur vermuten, die diese Körper mit beiden Seiten der septalen Pore verbindet. Experimente von Berns und Mitarbeitern (1992), bei denen Woronin Körper mit einer Laser-Pinzette von ihrer Position nahe des Septums entfernt wurden, zeigten, dass diese Strukturen nach erfolgter Verschiebung sofort wieder in ihre ursprüngliche Position zurückkehrten. Elektronen-mikroskopische Untersuchungen zeigten zehn Jahre später eine filamentöse Beschaffenheit dieser Verbindungsstruktur in *A. nidulans* (Momany *et al.*, 2002). Wie Woronin Körper die Pore verschließen, ist nach wie vor ungeklärt. Eine mögliche Erklärung stellt der cytoplasmatische Fluss dar, der verursacht durch Beschädigung der Zellwand, die Strukturen in die Öffnung des Septums drücken könnte. Dieses Modell würde zudem eine Erklärung für die Anwesenheit der Organellen auf beiden Seiten des Septums liefern. Ein Protein, das in Zusammenhang mit der Bindung von Woronin Körpern an die Zellwand steht, ist das Protein *leashin*, kurz LAH, welches zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich in *N. crassa* beschrieben war (Jedd, 2011).

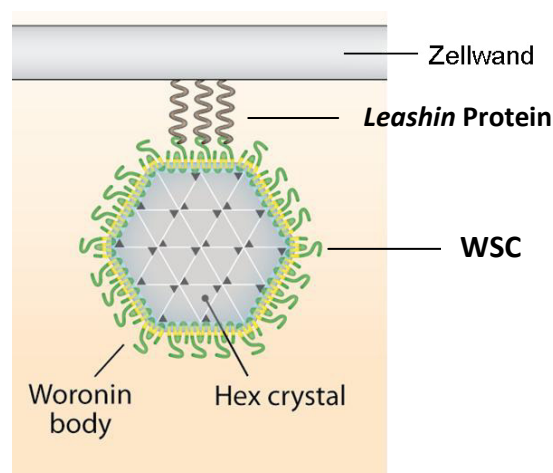


Abb.7: Darstellung eines reifen Woronin Körpers in *N. crassa*

Dieser ist durch das *tethering* Protein *Leashin* mit der lateralen Zellwand verankert. Woronin Körper werden dabei durch Interaktion des *Leashin* Proteins mit dem Woronin Körper spezifischen Membran-Protein WSC an die laterale Zellwand gebunden (modifiziert nach Pieuchot, L. and Jedd, G., 2012)

Das *lah* Gen kodiert für ein Protein von potentiell über 10.000 Aminosäuren, welches in *N. crassa* aber in zwei offene Leseraster geteilt wird. Das 5'-Gen kodiert dabei für LAH-1, welches an das Woronin Körper spezifische Membran-Protein WSC (*Woronin sorting complex*) auf der Oberfläche dieser Organellen bindet und diese dabei an die kortikale Zellwand bindet (Abb.: 7) (Ng *et al.*, 2009).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die nach wie vor bestehenden Defizite in der Behandlung von durch *A. fumigatus* verursachten Krankheiten, fordern die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen.

Eine vielversprechende Strategie stellt dabei die Schwächung der Fitness und Stressresistenz von *A. fumigatus* dar. Von besonderem Interesse sind daher Strukturen, die eine entscheidende Rolle bei der Stressresistenz und der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität spielen. Während einer *Aspergillus* Infektion sind Hyphen der entscheidende Morphotyp. Aufgrund ihres apikalen Wachstums fördern Hyphen die Infektion durch aktive Invasion des Gewebes und Durchbrechen der wirtsspezifischen Barrieren. Einen aussichtsreichen Angriffspunkt im Kampf gegen *A. fumigatus* stellen in diesem Zusammenhang Woronin Körper dar, welche für die zelluläre Integrität der Hyphe entscheidend mitverantwortlich sind. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Woronin Körpern in *A. fumigatus* zu klären. Dazu wurde durch Herstellung von Mutanten in zentralen Genen, die für die Synthese von Woronin Körpern bzw. für die korrekte Lokalisierung dieser an die Septen verantwortlich sind, die Relevanz dieser Strukturen für die Fitness und Pathogenität des Pilzes untersucht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit legte sich der Focus zunehmend auf Strukturen, die Woronin Körper am Septum verankern, sowie die dabei zu beobachtenden Unterschiede zwischen *A. fumigatus* und dem bisherigen Modellorganismus *N. crassa*.

2. Publikationen

- 2.1 Beck, J., Wagener, J., Ebel, F., 2013a. The septal cell wall of filamentous fungi. The fungal cell wall. Editor Hector Manuel Mora-Montes, Nova Biomedical, Chapter 5, 129-142.

Seite 24-45

CELL BIOLOGY RESEARCH PROGRESS

THE FUNGAL CELL WALL

HÉCTOR MANUEL MORA-MONTES
EDITOR



Copyright © 2013 by Nova Science Publishers, Inc.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means: electronic, electrostatic, magnetic, tape, mechanical photocopying, recording or otherwise without the written permission of the Publisher.

For permission to use material from this book please contact us:

Telephone 631-231-7269; Fax 631-231-8175

Web Site: <http://www.novapublishers.com>

NOTICE TO THE READER

The Publisher has taken reasonable care in the preparation of this book, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained in this book. The Publisher shall not be liable for any special, consequential, or exemplary damages resulting, in whole or in part, from the readers' use of, or reliance upon, this material. Any parts of this book based on government reports are so indicated and copyright is claimed for those parts to the extent applicable to compilations of such works.

Independent verification should be sought for any data, advice or recommendations contained in this book. In addition, no responsibility is assumed by the publisher for any injury and/or damage to persons or property arising from any methods, products, instructions, ideas or otherwise contained in this publication.

This publication is designed to provide accurate and authoritative information with regard to the subject matter covered herein. It is sold with the clear understanding that the Publisher is not engaged in rendering legal or any other professional services. If legal or any other expert assistance is required, the services of a competent person should be sought. FROM A DECLARATION OF PARTICIPANTS JOINTLY ADOPTED BY A COMMITTEE OF THE AMERICAN BAR ASSOCIATION AND A COMMITTEE OF PUBLISHERS.

Additional color graphics may be available in the e-book version of this book.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

ISBN: 978-1-62618-229-5

Library of Congress Control Number: 2013933187

Published by Nova Science Publishers, Inc. † New York

CONTENTS

Preface		vii
Chapter 1	The <i>Candida albicans</i> Cell Wall: Structure and Role in Morphogenesis and Immune Recognition <i>R. A. Hall, M. D. Lenardon, F. J. Alvarez, F. M. Nogueira, L. Mukaremera and N. A. R. Gow</i>	1
Chapter 2	<i>Sporothrix schenckii</i> Cell Wall <i>Leila M. Lopes-Bezerra, Luiz R. Travassos, Paula Kubitschek-Barreira and Marcel M. Lyra da Cunha</i>	27
Chapter 3	The Cell Wall of Dimorphic Pathogenic Species of <i>Paracoccidioides</i> <i>Rosana Puccia, Alisson L. Matsuo, Milene C. Vallejo and Larissa V. G. Longo</i>	47
Chapter 4	A Genomic Inventory of Cell Wall Biosynthesis in the Ubiquitous Plant Pathogen <i>Botrytis cinerea</i> <i>Piet W. J. De Groot, Ana Isabel Martinez and Luis Castillo</i>	91
Chapter 5	The Septal Cell Wall of Filamentous Fungi <i>Julia Beck, Johannes Wagener and Frank Ebel</i>	129
Chapter 6	Adherence, Virulence and Cell Wall Proteins of <i>Candida Glabrata</i> <i>Alejandro De Las Peñas, Emmanuel Orta-Zavalza, Verónica Martínez-Jiménez and Irene Castaño</i>	143
Chapter 7	Aspartyl Proteases in Human Pathogenic Fungi: Roles in Physiology and Virulence <i>Gaurav Bairwa, Sriram Balusu and Rupinder Kaur</i>	159
Chapter 8	Fungal Cell-Wall Antigens for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections <i>Estela Ruiz-Baca, Mayra Cuéllar-Cruz, Everardo López-Romero, María del Rocío Reyes-Montes and Conchita Toriello</i>	199

Chapter 9	Polysaccharides and Glycoproteins from Emerging Filamentous Pathogenic Fungi <i>Eliana Barreto-Bergter and P.A.J. Gorin</i>	233
Chapter 10	Endoglucanase Expression and Virulence in Plant Fungal Pathogens <i>Maria Aragona and Maria Teresa Valente</i>	253
Chapter 11	Altering the Fungal Cell Wall Integrity and Practical Aspects of These Modifications <i>Joanna S. Kruszevska and Sebastian Pilsyk</i>	275
Chapter 12	Transglutaminases: Critical Components of the Cell Wall Architecture in Fungi <i>Roberto Zazueta-Sandoval, Salvador Mormeneo, Maria Iranzo, Reyna Lucero Camacho, Areli Durón and Vanesa Zazueta-Novoa</i>	289
Index		309

Chapter

THE SEPTAL CELL WALL OF FILAMENTOUS FUNGI

Julia Beck¹, Johannes Wagener¹ and Frank Ebel^{1,2,}*

¹Max-von-Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität,
Munich, Germany

²Veterinärmedizinisches Department, Lehrstuhl für Bakteriologie und
Mykologie, LMU, Munich, Germany

ABSTRACT

The mycelium of filamentous fungi is a network of interconnected hyphae. In most filamentous fungal species these hyphae are compartmentalized by internal cell walls. The cytoplasm of neighbouring compartments is connected via septal pores thus establishing a hyphal network that is able to act as a functional entity. *Saccharomyces cerevisiae* proved to be an extremely valuable model for many aspects of cell biology; although usually growing in the yeast form, it can also form pseudohyphae and septae. Another process leading to the transient formation of septae is the budding of yeast that has been investigated in great detail in *S. cerevisiae*. This led to the identification of several key components and functional modules and provided the basis for further studies on the organization and function of septae in filamentous fungi. Septation is a dynamic process that is embedded in the complex framework of the hyphal organization. Here, several steps are of

* Ebel@mvp.uni-muenchen.de.

particular interest: (1) processes that determine the initiation and localization of the new septal plane, (2) the assembly and dynamics of the constricting actin ring, (3) the guided assembly of the emerging cell wall, and (4) the formation of a septal pore with a defined size. The characteristic cytoplasmic connections through septal pores link neighbouring compartments, but also pose a problem as any local injury is a potential threat for the whole mycelium. The septum therefore has to be able to seal damaged compartments in order to limit the harm. This is mediated by a distinct organelle, the Woronin bodies, enabling filamentous fungi to plug their septal pores. These organelles were first described nearly 150 years ago, but their function has only recently been studied in more detail. In conclusion, the septum of filamentous fungi is a fascinating compromise between separation and connection; it allows efficient exchange and transport of molecules and enables hyphae to respond as an entity, but it also provides a means for occlusion of cell-to-cell contact in case of hyphal rupture. This chapter summarizes the current knowledge on the organization and assembly of the septal cell wall and the function of Woronin bodies in filamentous fungi, focusing mainly on the Pezizomycotina.

1. THE HYPHAL ORGANIZATION OF FILAMENTOUS FUNGI

Fungal organisms can grow in two major morphologies: yeast and hypha (Harris, 2011). Each type provides advantages under certain conditions and especially pathogenic fungi often switch between the two forms (Sánchez-Martínez and Pérez-Martín, 2001). Hyphae are elongated and branched tubular structures that grow in a polarized fashion. Nuclear division and the formation of new cells are restricted to the apical region to enable the directed movement of the hyphal tips. Apical growth is governed by two processes, the internal turgor that provides the driving force and enhanced cell wall dynamics at the apex that result in an area of increased cell wall plasticity. Growing hyphae can follow gradients and are capable of invading a solid substrate, such as host tissue. Moreover, their ability to branch laterally allows the formation of a complex mycelial network that can explore a substratum in its whole. Hyphal growth requires the establishment of a polar axis and branching leads to a more complex array of polarity axes that requires coordination (Harris, 2008).

In higher fungi, such as the *Ascomycota*, hyphae are compartmentalized by specialized cross-walls or septae. This compartmentalization of the hyphal body is often required for functional specialization of individual cells, e.g., during (a)sexual reproduction or formation of the appressorium, a specialized

hyphal “pressing” structure enabling plant-pathogenic fungi to breach the robust cell wall of their hosts (Markham, 1994; Wang *et al.*, 2005). While septae can be used to seal-off individual cells, their normal role is to allow and control the flow of nutrients, molecules, and even organelles within the continuous composite of the mycelium. Different parts of a mycelium may encounter different environments. Due to the polar and directed growth, the tips will move towards nutrients, whereas distal hyphal segments may become trapped in environments that are depleted of nutrients. The hyphal organization allows long range transport between the parts and thereby enables efficient exploration and exchange of nutrients.

Cellular specialization is a characteristic feature of multicellular eukaryotic organisms, including filamentous fungi, and it is the base for their functional and morphological complexity. During mating distinct hyphae will fuse and compatibility factors will then decide whether such a fusion is maintained or abrogated. In case of incompatibility, programmed cell death mechanism will be activated in the connecting hyphal segment that originates from the fusion (Ni *et al.*, 2011). Programmed cell death is a highly controlled process that has to be restricted to a defined part of the organism to be beneficial (Ramsdale, 2008). This raises the problem of confining the distribution of molecules that provide the activating signal. A specific kind of controlled cell death has also been described to occur during autolysis of filamentous fungi, a process that can occur when fungi encounter severe nutrient starvation (White *et al.*, 2002). Autolysis is a means to recycle biomaterial from aging or starving hyphae; molecules are released and enable the survival and so-called ‘cryptic growth’ of hyphal tips. Several conditions can trigger cell death programs in filamentous fungi (Sharon *et al.*, 2009; Ramsdale, 2008) and in each case the ability to separate and seal-off parts of the mycelial network is clearly required; however, the underlying mechanisms are still largely unknown.

In the mycelium, distal compartments are arrested in interphase, while mitosis takes place in the apical segment (Fiddy and Trinci, 1976; Gladfelter and Berman, 2009). However, distal parts of hyphae retain the ability to re-establish polar growth at new branch points. The underlying specialization of apical and branching cells suggests the involvement of adjacent septal pores, but it remains to be determined whether and how certain microenvironments are established during branching.

The formation and function of the septum poses a challenge to the fungus in several respects. The septal pore is a bottleneck that has to be tightly controlled and this control requires a balance between permeability and

closure. During formation of new septae, synthesis of the cross-walls must be coordinated with hyphal growth, landmarks must be placed at suitable sites to determine the position for the new septae and the centripetal growth of the cell wall must be orchestrated to form a central pore with a defined size that fits the needs of the respective fungus.

A mycelium can reach an enormous size and during growth it will encounter situations of local stress that may compromise the integrity of the cell wall. The interconnected mycelial organization then turns into a potential threat, since local injuries can cause massive cytoplasmic bleeding that may challenge the survival of the whole structure. To limit the damage, fungi developed a mean to plug the septal pore. This is mediated by Woronin bodies; small, specialized organelles that were first described by Michail Woronin in 1864. Woronin bodies derive from peroxisomes, but possess unique structural features that clearly distinguish them from normal peroxisomes (Jedd and Chua, 2000).

This review covers processes and structures that allow a functional compartmentalization of hyphae and focuses in particular on the organization and synthesis of two structures: the septal cross-wall and the septal pore. Research in many fungal organisms has contributed to our current knowledge, but for the Pezizomycotina two model organisms are currently of particular importance, *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, and they are in particular focus throughout this review.

2. THE FORMATION OF THE SEPTAL CELL WALL

Septation is tightly controlled and coordinated with growth and in particular by the completion of nuclear division. However, due to the multi-nucleated nature of hyphal cells, not every nuclear division can result in the formation of a septum. This is particularly evident during germination, when several rounds of mitosis precede the formation of the first septum that typically appears at the junction between the basal end of the germ tube and the conidial body (Clutterbuck, 1970). It is assumed that a certain size or volume has to be reached before compartmentalization can take place (Wolkow *et al.*, 1996). Following the first septation event, each passage through the duplication cycle is terminated by the formation of a septum in the hyphal tip compartment. The size of the resulting hyphal cells is not accidental, but is tightly controlled. Signals emanating from nuclear division seem to set landmarks on the hyphal cell wall that define the site where cross-

wall synthesis will be initiated. In *A. nidulans* nuclear division is synchronized; mitotic nuclei, but not nuclei in interphase have been shown to define the septal division plane (Seiler and Justa-Schuch, 2010).

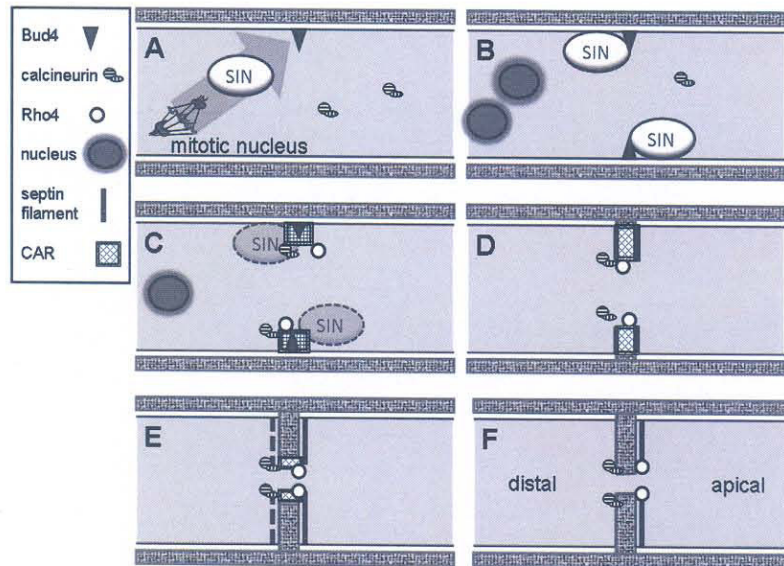


Figure 1. A simplified schematic model of the septation process in *Aspergillus*. Panel A: A positional signal emanates from a mitotic nucleus and activates the Septation Initiation Network (SIN). Calcineurin and other signaling molecules may already influence the septation process during this step. Panel B: The landmark protein Bud4 is guided by the SIN and defines the plane where the new septum is formed. Panel C: Bud4 recruits the small GTPase Rho4 that initiates the formation of a Contractile Actin Ring (CAR). This specialized actin structure comprises many proteins including the formin SepA. Panel D: The CAR is constricting and a septin double ring is formed. Panel E: When the final size of the septal pore is reached the distal septin ring will disassemble. Panel F: Several proteins, including calcineurin and Rho4, remain associated with the mature septal pore.

The course of events taking place during septation in the model fungus *A. nidulans* is summarized in a simplified model in Figure 1. Genetic evidence suggests a crucial role for the cyclin-dependent kinase NimX as the regulatory link between nuclear division, cell size, and septum formation (Harris and Kraus, 1998). NimX-derived signals are relayed to a signaling module, called the Septation Initiation Network (SIN) that in essence consists of a cascade of three kinases (Kraus and Harris, 2001; Simanis, 2003). SIN components are

localized in the spindle pole bodies, but can be targeted to the site of septum formation (Kim *et al.*, 2009a), where they control the recruitment of the septin AspB and the formin SepA, which in turn initiate the assembly of the contractile actin ring (CAR). The CAR is a dynamic membrane-associated structure that guides and promotes the deposition of cell wall material. Several common components of the actin cytoskeleton have been identified as components of the CAR, e.g., tropomyosin, α -actinin, and myosin I (Laporte *et al.*, 2010).

The homologs of *S. cerevisiae* axial bud site markers Bud3 and Bud4 have been identified in *A. nidulans* and *N. crassa*, and work as *bona fide* landmark proteins (Justa-Schuch *et al.*, 2010; Si *et al.* 2010). The earliest step in septum formation is the appearance of a ring of the anillin-related Bud4 protein. In vertebrates anillin is recruited early to the cleavage furrow of dividing cells and provides a scaffold for Rho GTPases (Hickson and O'Farrell 2008). During septum formation Bud4 is required for the recruitment of Bud3, which in turn is a guanine nucleotide exchange factor of the small GTPase Rho4. The Bud4-Bud3-Rho4 complex seems to be a very early molecular correlate of the process leading to septum formation, but whether it really defines the site of septation or merely marks a pre-defined site is still unclear (Seiler and Justa-Schuch, 2010). Moreover, the presence of Bud4-Bud3-Rho4 in mature septae raises questions on the precise function(s) of this complex (Justa-Schuch *et al.*, 2010). Another relevant protein during initiation of septation in *A. nidulans* is TeaC. This protein localizes to hyphal tips and septae and its over-expression represses septum formation, whereas deletion of the corresponding gene results in an increased septation and defects in polar growth (Higashitsuji *et al.*, 2009).

TeaC is known to interact with the formin SepA (Higashitsuji *et al.*, 2009). Formins are found at the barbed (or fast growing) ends of actin filaments, where they facilitate the incorporation of new actin monomers. The activity of formins is under tight control by signalling components, in particular small GTPases of the Rho family (Dong *et al.*, 2003). In *A. nidulans*, SepA is required for CAR assembly and septum formation (Sharpless and Harris, 2002) and its activity is controlled by the small GTPase Rho4 (or RhoD). Interestingly, Rho4 is the only member of the Rho-family that is specific for filamentous fungi. In *N. crassa* and fission yeast, Rho4 is essential for septation and CAR assembly (Nakano *et al.*, 2003; Rasmussen and Glass, 2005) and the corresponding mutants in *A. niger* and *A. fumigatus* are also unable to form septae (Kwon *et al.*, 2011; Dichtl *et al.*, 2012). Bud3 and RGF3 are the guanidine exchange factors of Rho4 in *A. nidulans* and *N. crassa* and

the phenotype of the respective mutants resembles that of the *rho4* mutants (Si *et al.*, 2010; Justa-Schuch *et al.*, 2010).

Septins are found throughout the eukaryotic kingdom, with the exception of plants. They belong to the P-loop GTP-binding proteins, assemble into apolar filaments, and form scaffolds. During septation they form ring-like structures on the inner surface of the plasma membrane (Spiliotis and Gladfelter, 2012). These septin rings build scaffolds for proteins that are required for septum formation. Thereby, septins control the assembly and maintenance of specialized macromolecular structures that drive the process of septation. Septins are also known to influence cytoskeletal reorganisation and dynamic membrane-associated processes, such as cytokinesis, vesicle trafficking, and polarity (Mostowy and Cossart 2012). This makes septins key molecules in processes that break cellular symmetry and establish polarity. The conserved N-terminal domain of septins binds to phosphatidyl-inositol phosphates, such as PtdIns-4P or PtdIns-5P, and thereby anchors these proteins to the plasma membrane. Several functions have been postulated for membrane-associated septin filaments: curving and rigidifying of membranes as well as inhibition of lateral diffusion of membrane proteins (Spiliotis and Gladfelter, 2012). AspB is the most highly expressed septin in *A. nidulans* and is found in association with the septal cross wall. Deletion of the *aspB* gene results in delayed septation, demonstrating that AspB is involved, but not essential for septum formation (Hernández-Rodríguez *et al.* 2012). AspB initially co-localizes with the CAR as a ring and this process is governed by the SIN pathway. However, the AspB ring does not constrict, but it splits into a double ring flanking the septum (Westfall and Momany 2002). The membrane compartment defined by these rings may facilitate the targeting of chitin synthases and other components needed for the centripetal growth of the emerging septal wall (Rittenour *et al.*, 2009). Moreover, the septin rings may establish areas of increased membrane rigidity that flank a more flexible internal ring that is capable of forming the characteristic centripetal membrane protrusion. Septins recruit formins and thereby determine the spatial organization and dynamics of the CAR. As soon as the septal cell wall has been formed, the distal AspB ring disappears, while the apical ring is maintained (Westfall and Momany 2002). Notably, a corresponding septin double ring is also found in *Candida albicans* hyphae, but here the apical ring disappears and the distal ring persists (Warenda and Konopka, 2002); both asymmetric patterns likely provide directional markers that mirror the hyphal-tip polarity.

The process of septation also affects the distribution of organelles. The endoplasmic reticulum (ER) is remarkably dynamic and septation leads to a discontinuity of the ER network in the septal plane. A characteristic ER structure emerges at the constricting septal pore that shrinks during centripetal growth of the walls and finally disappears. When the mature septum is formed the ER network approaches the distal site of the new septum and this asymmetry is then maintained (Maruyama and Kitamoto, 2007). This and the organization of septum-associated microtubule organizing centers (Konzack *et al.*, 2005) demonstrates that the mature septum provides positional information that reflects the direction of hyphal polarity and influences the organization and distribution of major cellular structures.

The complex of actin, SepA and other CAR components forms the constricting ring that provides the pushing force for the centripetal growth of the emerging septal cross-wall and accordingly this structure is disassembled when septum formation is completed. Chitin is a major and readily detectable constituent of the fungal cell wall and also a prominent component of the septal wall. From the eight chitin synthases of *A. nidulans* four have been implicated in septum formation (Horiuchi, 2009; Ichinomiya *et al.*, 2005). Among them are two, CsmA and CsmB, that localize to forming septa and contain myosin-motor-binding domains that may target them to the CAR (Takeshita *et al.*, 2006). The class I and class II chitin synthases, ChsA and ChsC, seem to be directly involved in septum formation, whereas the class V and VI chitin synthases, CsmA and CsmB, may have a more specific function in chitin deposition around the forming septal pore (Horiuchi, 2009). Chitosomes are vesicular organelles that are found in many fungi and represent the main vehicle for delivering chitin synthases and chitin microfibrils to the cell surface (Bartnicki-Garcia, 2006). The internal flow of secretory vesicles to the cell membrane is generally referred to as exocytosis. For a long time it was assumed that in filamentous fungi exocytosis was restricted to the hyphal tip, but recently Hayakawa *et al.* (2011) have demonstrated a septum-directed secretion mechanism in *A. oryzae*. Thus, the hyphal tip and the septum are areas of enhanced cell wall dynamics that require an enhanced transport of molecules and vesicles to the cell surface.

In fission yeast, calcineurin has been implicated in the formation of septae and appears to function upstream of the SIN (Lu *et al.*, 2002). In *A. fumigatus* the calcineurin complex localizes to hyphal tips and septae. The catalytic CnaA subunit is targeted to the septum and trails the regulatory CnaB subunit (Juvvadi *et al.*, 2008; Juvvadi *et al.*, 2011). Mutants that lack both calcineurin genes show irregular wavy septae and the formation of shorter compartments

(Juvvadi *et al.*, 2011), a phenotype similar to that observed for a class III chitin synthase *chsB* mutant (Fukuda *et al.*, 2009). Calcineurin is not required for CAR formation, but co-localizes with the actin ring and remains associated with the septum after CAR disassembly. This and the finding that mutants lacking a functional cAMP-dependent protein kinase show severe defects in septum formation (Bruno *et al.*, 1996) underline the fact that the formation of the septal cross-wall is embedded into and depends on the complex signalling network of the entire fungal cell.

4. CLOSING THE DOOR: THE WORONIN BODIES

The majority of the filamentous fungi form septae. However, there are fungi that lack septae but manage to overcome the disadvantages and threads of a non-compartmentalized hyphal organization. Some thermotolerant *Mucor* species are even pathogenic. In humans they are the causative agent of zygomycosis, the most acute and fulminate invasive mycosis known (Richardson, 2009). The notorious failure in obtaining viable isolates from patients with zygomycosis is most likely a consequence of the coenocytic architecture of these fungi that renders them extremely sensitive to mechanical damage.

Woronin bodies are electron-dense organelles. Depending on the species, they have a diameter of 100-750 nm and this size is sufficient to block the corresponding septal pores in any given species (Markham, 1994). The ability of Woronin bodies to plug septal pores and thereby limit the cytoplasmic bleeding after injury was first described in *Fusarium* (Reichle and Alexander, 1965). Similar observations were later also reported for *N. crassa*, *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus oryzae* (Trinci and Collinge, 1974; Collinge and Markham, 1987; Maruyama *et al.*, 2005). The difference in the osmotic pressure between the intact and the empty compartment often leads to a characteristic bending of the plugged septal wall. The initial sealing is followed by consolidation and cell wall material deposition at the cytoplasmic side of the pore as well as resealing of the cytoplasmic membrane (Markham, 1994; Collinge and Markham, 1987). At the end of this process, the intact compartment is irreversibly separated from the damaged part of the hypha. However, a re-initiation of tip growth at sealed septal pores can occur and has been observed in *N. crassa* and *A. nidulans*. This specific type of growth results in the formation of intra-hyphal hyphae that grow initially within the empty tube of the damaged hyphal segment.

Woronin bodies are large and dense organelles that are only found in filamentous ascomycetes. Their major component is a protein that in *N. crassa* has been designated HEX-1 (Jedd and Chua, 2000). HEX-1 contains a C-terminal peroxisomal targeting signal 1 (PTS-1) motif that targets the newly synthesized protein to these organelles. *In vitro* purified HEX-1 forms hexagonal rods, whereas in peroxisomes it assembles into a crystal sub-membranous lattice that is essential for the generation and function of Woronin bodies (Yuan *et al.*, 2003). HEX-1 assembly starts in a certain area of the internal peroxisomal membrane due to the interaction of HEX-1 with the integral membrane protein WSC-1 and this leads to asymmetric peroxisomal budding intermediates that mature to Woronin bodies (Liu *et al.*, 2008). Hex-1 oligomers also interact and recruit PEX26, a key component of the peroxisomal import machinery that promotes the import of HEX-1 monomers and thereby provides a positive feedback-loop for the generation of larger HEX-1 structures (Liu *et al.*, 2011). The formation of a nascent Woronin body in a peroxisome seems to be associated with a strict protein sorting mechanism that discriminates between Woronin body- and non-Woronin body-proteins. Red fluorescent protein that is targeted to the peroxisomes of *A. fumigatus* by a C-terminal HexA-PTS1 signal is excluded from nascent Woronin bodies (Beck and Ebel, unpublished data) and in a recent proteomic analysis of purified Woronin bodies from *N. crassa* only HEX-1 has been identified, suggesting that the matrix of this organelle is exclusively filled with the HEX-1 hexagonal crystal (Managadze *et al.*, 2010).

Woronin bodies can vary in size and morphology in different fungi as mentioned. Round Woronin bodies are characteristic of *Aspergillus*, whereas *Neurospora* Woronin bodies tend to have a square-shaped or hexagonal morphology. Mutants in *hex-1* and homologous genes bleed cytoplasm after cellular wounding and show several secondary defects, such as an impaired conidiation (Jedd and Chua, 2000; Soundararajan *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2005). In an early electron microscopy study of *A. nidulans* germlings, Woronin bodies were found in proximity to the septal pore, but also in large numbers at the hyphal tip (Momany *et al.*, 2002). In *N. crassa* Woronin bodies are not found in the vicinity of the septum, but are associated with the hyphal cell wall instead (Jedd and Chua, 2000). According to a model proposed by Jedd and co-workers, this architecture has developed in *Neurospora* and *Sordaria* to permit the fast flow of cytoplasm that is characteristic for these fungi and enables them to grow extremely fast (Jedd, 2011; Ng *et al.*, 2009).

The presence of Woronin bodies at the septum of Pezizomycotina places them close to the site where they are needed in case of damage, and this

specific localization suggests the existence of a structure that anchors them at either side of the septal pore. The simplest mechanistic model for plugging is one in which the cytoplasmic flow caused by a cell wall injury pushes the Woronin body into the pore. This concept also provides an explanation for the presence of Woronin bodies on either side of the pore. In the *Pezizomycotina*, the majority of the Woronin bodies are also found in locations other than the septum and this is shown for *A. fumigatus* in Figure 2. The precise localization of these organelles and their biological function is unclear. The anchoring of Woronin bodies to the cortical cell wall in *Neurospora* indicates a more complex plugging mechanism that requires the controlled release of these organelles from the cell wall.

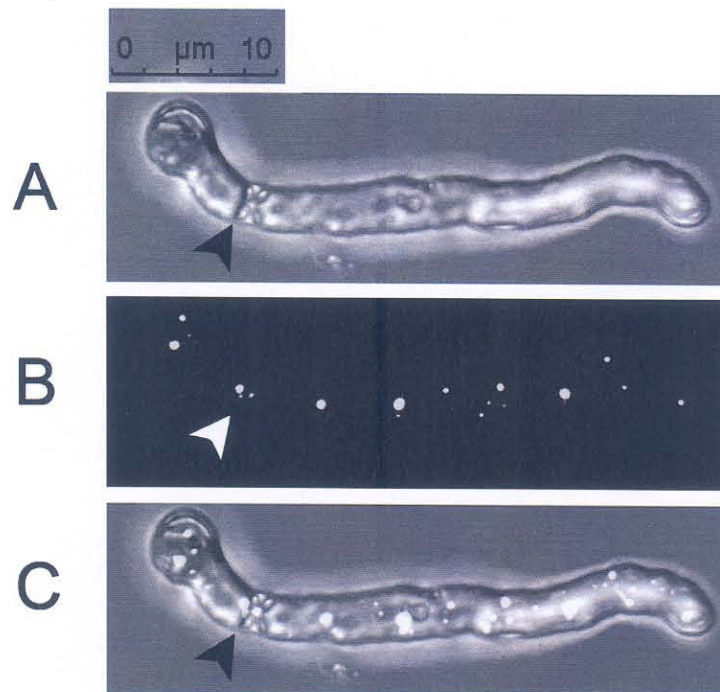


Figure 2. Localization of Woronin bodies in an *A. fumigatus* germling. Woronin bodies in an *A. fumigatus* germling are visualized using a GFP-HexA fusion protein. The position of a septum is indicated by arrowheads. Panel A: bright field image. Panel B: GFP fluorescence. Panel C: overlay. Note the high number of Woronin bodies that are not associated with the septum.

Leashins are very large proteins and in the Pezizomycotina they comprise more than 5000 amino acids (Jedd, 2011). Leashins have recently been described as tethers that anchor Woronin bodies to the cell wall. In *N. crassa* the leashin gene is split into two open reading frames. The 5'-gene encodes leashin-1 that binds to WSC-1 on the surface of Woronin bodies and additionally anchors the organelle at the cortical cell wall. The leashin-2 protein localizes to the septal cell wall or the apical tip of hyphae, but apparently shows no interactions with Woronin bodies. Notably, a fusion of both proteins expressed in *N. crassa* tethers Woronin bodies to the septal spore and thereby restores the ancestral pattern of localization found in most Pezizomycotina (Ng *et al.*, 2009).

Fungi lacking HEX proteins show enhanced cytoplasmic bleeding after mycelial trauma. The consequence of this increased sensitivity to stress is a reduced fitness, suggesting a role for Woronin bodies in virulence. However, only one corresponding study has been published to date. A *hex* mutant in the plant pathogen *Magnaporthe grisea* turned out to be impaired in the initial invasion of plants and in the subsequent spread to the plant tissue. Woronin bodies were shown to be required for proper development and function of appressoria as well as growth under nitrogen starvation (Soundararajan *et al.*, 2004). The observed defect in appressoria formation points to the role of Woronin bodies in separating cells to allow cell differentiation and establishing high turgor pressure. Plugging of septal pores by Woronin bodies has also been implicated in aging and hyphal fusion that occurs during mating (Fleißner and Glass, 2007). It is therefore likely that a closer examination of mutants that lack functional Woronin bodies will reveal further defects in processes of cell differentiation.

Cytoplasmic bleeding caused by a local injury of the hyphal cell wall bears the risk of extensive fungal damage and therefore requires the fungus to be able to seal the site of rupture and/or the adjacent septal pores, both are bottlenecks that can be plugged by Woronin bodies, but also by other organelles or larger cellular material. The SO protein of *N. crassa*, encoded by the *soft* gene, accumulates in a Woronin body-independent manner at plugged septae, where it contributes to the sealing of the pore (Fleißner and Glass, 2007). Notably, an SO deletion mutant is also impaired in hyphal fusion and colony development. It was observed that the occlusion of pores proximal to those hyphal compartments that die due to heterokaryon incompatibility was SO-dependent, but Woronin body-independent (Fleißner and Glass, 2007). A GFP-fusion of the homologous SO protein in *A. oryzae* shows accumulation at the septal pore adjacent to the injured compartment, but dispersal throughout

the cytoplasm under normal growth conditions (Maruyama *et al.*, 2010). Interestingly, AoSO is also recruited to the septal pore in response to various stress conditions, including low and high temperature, extreme acidic and alkaline pH, and nitrogen and carbon depletion (Maruyama *et al.*, 2010).

Although ample evidence suggests that Hex proteins are by far the most abundant constituent of Woronin bodies, recent studies revealed the presence of additional proteins. The PRO40 protein in *Sordaria macrospore* has been localized within Woronin bodies and PRO40 has been shown to be essential for fruiting body maturation (Engh *et al.*, 2007). TmpL is a transmembrane protein that has also been localized to Woronin bodies. TmpL was recently shown to control intracellular reactive oxygen species levels in the plant pathogen *Alternaria brassicicola* and a mutant exhibits abnormal conidiogenesis, enhanced oxidative burst during conidiation, accelerated aging, and hypersensitivity to oxidative stress. TmpL is furthermore required for appressoria formation and infection of plants by *A. brassicicola* and for infection of mammals by the human pathogen *A. fumigatus* (Kim *et al.*, 2009b). Notably, TmpL is targeted exclusively to Woronin bodies that are not directly associated with the septal pore. This is the first evidence for functional specialization in different subsets of Woronin bodies and the data suggest that those Woronin bodies that are not tethered to the pore play an important role in the control of oxidative stress.

CONCLUSION

Filamentous fungi are interesting models to study cell differentiation and cell-to-cell communication. The structural element that enables compartmentalization and, as a consequence, a multi-cellular organization of hyphae is the septum. Although recent studies have already provided substantial insights into the mechanisms controlling septation and septum function, there is still a long way to an in-depth understanding of these processes. Simple questions, for example how a cell decides where a new septum is positioned, are in fact complicated and require an integrated understanding of the whole cellular machinery. However, filamentous fungi seem to be ideally suited to address such fundamental questions:

They are easy to handle, fast growing, genetically tractable and the genome sequences of the most relevant species are already available.

REFERENCES

- Bartnicki-Garcia S. (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res.* 6:957-965.
- Bruno KS, Aramayo R, Minke PF, Metzenberg RL, Plamann M (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 15: 5772-5782.
- Clutterbuck AJ. (1970) Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 60:133-5.
- Collinge A J and Markham P. (1987) Response of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae following rapid Woronin body plugging of septal pores. *FEMS Microbiol. Lett.* 40:165-168.
- Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. (2012) Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol.* 83:506-19.
- Dong Y, Pruyne D, Bretscher A. (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol.* 161:1081-1092.
- Engh I, Wurtz C, Witzel-Schlomp K, Zhang HY, Hoff B, et al. (2007) The WW domain protein PRO40 is required for fungal fertility and associates with Woronin bodies. *Eukaryot Cell* 6: 831-843.
- Fiddy C, Trinci AP. (1976) Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 97:169-184.
- Fleissner A, Glass NL. (2007) SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot Cell.* 6:84-94.
- Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. (2009) Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell.* 8:945-956.
- Gladfelter A, Berman J. (2009) Dancing genomes: fungal nuclear positioning. *Nat Rev Microbiol.* 7:875-886.
- Harris SD. (2011) Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biol.* 115:475-484.
- Harris SD. (2008) Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia.* 100:823-32.

- Harris SD, Kraus PR. (1998) Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. *Genetics* 148:1055-1067.
- Hayakawa Y, Ishikawa E, Shoji JY, Nakano H, Kitamoto K. (2011) Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol.* 81:40-55.
- Hernández-Rodríguez Y, Hastings S, Momany M. (2012) The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell.* 11:311-323.
- Hickson GR, O'Farrell PH. (2008) Anillin: a pivotal organizer of the cytokinetic machinery. *Biochem Soc Trans.* 36:439-441.
- Higashitsuji Y, Herrero S, Takeshita N, Fischer R. (2009) The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 8:957-967.
- Horiuchi H. (2009) Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med Mycol.* 47 Suppl 1:S47-52.
- Ichinomiya M, Yamada E, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. (2005) Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 4:1125-1136.
- Jedd G. (2011) Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol.* 21:12-19.
- Jedd G, Chua NH. (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol.* 2:226-31.
- Justa-Schuch D, Heilig Y, Richthammer C, Seiler S. (2010) Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 76:220-235.
- Juvvadi PR, Fortwendel JR, Pinchai N, Perfect BZ, Heitman J, Steinbach WJ. (2008) Calcineurin localizes to the hyphal septum in *Aspergillus fumigatus*: implications for septum formation and conidiophore development. *Eukaryot Cell.* 7:1606-1610.
- Juvvadi PR, Fortwendel JR, Rogg LE, Burns KA, Randell SH, Steinbach WJ. (2011) Localization and activity of the calcineurin catalytic and regulatory subunit complex at the septum is essential for hyphal elongation and proper septation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 82:1235-59.
- Kim JM, Zeng CJ, Nayak T, Shao R, Huang AC, Oakley BR, Liu B. (2009a) Timely septation requires SNAD-dependent spindle pole body localization

- of the septation initiation network components in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*. 20:2874-84.
- Kim KH, Willger SD, Park SW, Puttikamonkul S, Grahl N, Cho Y, Mukhopadhyay B, Cramer RA Jr, Lawrence CB. (2009b) TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and an animal fungal pathogen. *PLoS Pathog*. 5:e1000653.
- Konzack S, Rischitor PE, Enke C, Fischer R. (2005) The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*. 16:497-506.
- Kraus PR, Harris SD. (2001) The *Aspergillus nidulans* *snt* genes are required for the regulation of septum formation and cell cycle checkpoints. *Genetics* 159:557-569
- Kwon MJ, Arentshorst M, Roos ED, van den Hondel CA, Meyer V, Ram AF. (2011) Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol Microbiol*. 79:1151-67.
- Laporte D, Zhao R, Wu JQ. (2010) Mechanisms of contractile-ring assembly in fission yeast and beyond. *Semin Cell Dev Biol*. 21:892-898.
- Liu F, Ng SK, Lu Y, Low W, Lai J, Jedd G. (2008) Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *J Cell Biol*. 180:325-339.
- Liu F, Lu Y, Pieuchot L, Dhavale T, Jedd G. (2011) Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Dev Cell*. 21:457-468
- Lu Y, Sugiura R, Yada T, Cheng H, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T. (2002) Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells*. 7:1009-19.
- Managadze D, Würtz C, Wiese S, Meyer HE, Niehaus G, Erdmann R, Warscheid B, Rottensteiner H. (2010) A proteomic approach towards the identification of the matrix protein content of the two types of microbodies in *Neurospora crassa*. *Proteomics*. 10:3222-3234.
- Markham P. (1994) Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycol Res*. 98: 1089-1106.
- Maruyama J, Kitamoto K. (2007) Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 272:1-7.
- Maruyama J, Escaño CS, Kitamoto K. (2010) AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 391:868-873.

- Maruyama J, Juvvadi PR, Ishi K, Kitamoto K. (2005) Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:1081-1088.
- Momany M, Richardson EA, Van Sickle C, Jedd G. (2002) Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia* 94:260-266.
- Mostowy S, Cossart P. (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13:183-194.
- Nakano K, Mutoh T, Arai R, Mabuchi I. (2003) The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* 8:357-370.
- Ng SK, Liu F, Lai J, Low W, Jedd G. (2009) A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS Genet*. 5:e1000521.
- Ni M, Feretzaki M, Sun S, Wang X, Heitman J. (2011) Sex in fungi. *Annu Rev Genet*. 45:405-430.
- Ramsdale M. (2008) Programmed cell death in pathogenic fungi. *Biochim Biophys Acta*. 1783:1369-1380.
- Rasmussen CG, Glass NL. (2005) A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 4:1913-25.
- Reichle RE, Alexander JV. (1965) Multiperforate septations, Woronin bodies, and septal plugs in *Fusarium*. *J Cell Biol*. 24:489-496.
- Richardson M. (2009) The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect*. 15 Suppl 5:2-9.
- Rittenour WR, Si H, Harris SD. (2009) Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol*. 23: 20-29.
- Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín J. (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol*. 4:214-221
- Seiler S, Justa-Schuch D. (2010) Conserved components, but distinct mechanisms for the placement and assembly of the cell division machinery in unicellular and filamentous ascomycetes. *Mol Microbiol*. 78:1058-1076.
- Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I. (2009) Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiol Rev*. 2009 33:833-854.
- Sharpless KE, Harris SD. (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell*. 13:469-479.

- Si H, Justa-Schuch D, Seiler S, Harris SD. (2010) Regulation of septum formation by the Bud3-Rho4 GTPase module in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 185:165-176.
- Soundararajan S, Jedd G, Li X, Ramos-Pamplona M, Chua NH, Naqvi NI. (2004) Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *Plant Cell*. 16:1564-1574.
- Spiliotis ET, Gladfelter AS. (2012) Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic*. 13:195-203.
- Simanis V. (2003) The mitotic exit and septation initiation networks. *J Cell Sci*. 116:4261-4262.
- Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol*. 59:1380-1394.
- Trinci AP, Collinge AJ. (1974) Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma*. 80:57-67.
- Wang ZY, Jenkinson JM, Holcombe LJ, Soanes DM, Veneault-Fourrey C, Bhambra GK, Talbot NJ. (2005) The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochem Soc Trans*. 33:384-388.
- Warena AJ, Konopka JB. (2002) Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 13:2732-2746.
- Westfall PJ, Momany M. (2002) *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol Biol Cell*. 13:110-118.
- Wolkow TD, Harris SD, Hamer JE. (1996) Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J Cell Sci*. 109 :2179-88.
- White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol*. 22:1-14.
- Woronin, M. (1864) Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pucherrimus* Cr. und einiger Pezizen. *Abh Senkenb Naturforsch* 5:355-344.
- Yuan P, Jedd G, Kumaran D, Swaminathan S, Shio H, Hewitt D, Chua NH, Swaminathan K. (2003) A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*. *Nat Struct Biol*. 10:264-270.

- 2.2 Beck, J., Ebel, F., 2013b. Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol. 303(2), 90-97.

Seite 47 - 54



Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*

Julia Beck, Frank Ebel*

Max-von-Pettenkofer-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2012

Received in revised form 6 November 2012

Accepted 11 November 2012

Keywords:

Aspergillus fumigatus

Pathogenic fungi

Stress resistance

Hyphal architecture

Live-cell microscopy

ABSTRACT

In filamentous fungi, the septal pore controls the exchange between neighbouring hyphal compartments. Woronin bodies are fungal-specific organelles that plug the pore in case of physical damage. The Hex protein is their major and essential component. Hex proteins of different size are predicted in the data base for pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. However, using specific monoclonal antibodies, we identified 2 dominant HexA protein species of 20 and 25 kDa in *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, and *A. oryzae*. HexA and Woronin bodies were found in *A. fumigatus* hyphae, but also in resting conidia. Using monoclonal antibodies, a GFP-HexA fusion protein, and an RFP protein fused to the putative peroxisomal targeting sequence of HexA, we analyzed the spatial localization and dynamics of Woronin bodies in *A. fumigatus* as well as their formation from peroxisomes. In intact hyphae, some Woronin bodies were found in close proximity to the septal pore, while the majority was distributed in the cytoplasm. Septum-associated Woronin bodies show a minimal lateral movement, while the cytosolic Woronin bodies are highly dynamic. The distribution of Woronin bodies and their co-localization pattern with peroxisomes revealed no evidence that Woronin bodies arise predominantly at the apical tip of *A. fumigatus* hyphae. We found that Woronin bodies are able to plug septal pores of *A. fumigatus* in case of damage. Woronin bodies therefore contribute to the stress resistance and potentially also to the virulence of *A. fumigatus*, which renders them a potential target for future anti-fungal strategies.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The mycelium of filamentous fungi is a three-dimensional network of interconnected multi-nucleated hyphae. Individual cells or compartments are separated by septa, but in the absence of stress, their cytoplasm remains connected via the septal pores. This organisation allows an efficient exchange and transport of molecules and even organelles; it enables filamentous fungi to respond to external cues as a functional entity and to exploit environmental resources in a very efficient manner. However, the presence of a continuous cytoplasm also poses a problem, as local injuries represent a potential threat for the whole hyphal network. *Pezizomycotina* have developed an organelle to plug septal pores in case of damage, and these so-called Woronin bodies were first described by Michail Stepanowitsch Woronin in 1864 (Woronin, 1864). In many fungi, Woronin bodies are found in proximity to the septal pore. They contain a dense core that assembles at the peroxisomal membrane (Jedd and Chua, 2000). Its major component, the Hex-1 protein, forms a crystal lattice that is essential for Woronin body formation and function (Yuan et al., 2003). In damaged cells, Woronin bodies

rapidly plug septal pores (Reichle and Alexander, 1965; Collinge and Markham, 1985), and mutants lacking *hex-1* or homologous genes show extensive cytoplasmic bleeding after cellular wounding and several secondary defects such as impaired conidiation (Jedd and Chua, 2000; Soundararajana et al., 2004; Maruyama et al., 2005). Our current knowledge on the organization and function of Woronin bodies has been established using *Neurospora crassa* as a model organism for filamentous fungi. However, *N. crassa* has some unique features, such as an extremely rapid growth and a continuous and fast cytoplasmic flow, thus distinguishing it from most other filamentous fungi, e.g. important fungal pathogens, such as *Aspergillus fumigatus*.

A. fumigatus is the major cause of invasive aspergillosis, a severe and systemic infection in immunocompromised patients. The high mortality is largely due to the suboptimal diagnostic and therapeutic options and the unspecific symptoms of this disease (McCormick et al., 2010). The identification of new therapeutic target structures is therefore an urgent need. For 2 reasons, Woronin bodies are particularly interesting in this context; they are fungal-specific organelles, and their loss has a high probability to cause an impaired stress resistance and virulence. Here, we have started to characterize the HexA protein of *A. fumigatus*. Using monoclonal antibodies and fluorescent fusion proteins, we demonstrate that Woronin bodies plug the septal pore in damaged *A. fumigatus* hyphae. Using live

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 72863.
E-mail address: ebel@mvp.uni-muenchen.de (F. Ebel).

cell imaging, we furthermore provide first insights in their spatial and temporal distribution and dynamics.

Materials and methods

Strains and media

The *A. fumigatus* strain Afs35 is a derivative of strain D141 lacking the homologous end-joining component *AkuA* (Krappmann et al., 2006). Aspergillus minimal medium (AMM) and yeast glucose medium (YG) medium were prepared as described (Kotz et al., 2010), but in this study AMM was supplemented with 0.2 M ammonium chloride as nitrogen source.

Sequence analysis and data base searches

Sequences from *Aspergillus* Hex-1 homologous sequences were obtained from the Central *Aspergillus* Resource (CADRE; <http://www.cadre-genomes.org.uk/>). Homology searches were performed using BlastP at Fungal Genomes Central – NCBI – NIH (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi). Sequence alignments were generated using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). cDNA of *A. fumigatus* strain D141 was kindly provided by Sweta Samantaray and Johannes Wagener. Chromosomal and cDNA was analyzed using oligonucleotides HexA-5' (ATG GGT TAC TAC GAC GAC GAC) and HexA-3' (TTA CAG ACG GGA ACC GTG GAT GAC CTT). The large and the smaller amplicons obtained from cDNA were sequenced using oligonucleotide sGFP-300bp-rev (GAA GAA GAT GGT GCG CTC) (GATC AG, Constance, Germany).

Generation of monoclonal antibodies

The last 1065 bp of AFUA_5G08830 (corresponding to exon 4) were amplified using the oligonucleotides HexA-5'-XhoI (GCGCTCGAGTACCGTGAATCCACTTCTCGC) and HexA-3'-XhoI (CGCCTCGAGCAGACGGGAACCGTGGATGAC). The fragment obtained after digestion with XhoI was cloned into the XhoI site of the expression vector pET21b(+) (Novagen, Darmstadt, Germany). After transformation into *E. coli* strain BL21, a clone over-expressing a His-tagged protein of approximately 40 kDa was selected, and the fragment was sequenced. The recombinant protein was purified using Protino Ni-IDA 100 columns according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Balb/c mice were immunized, and hybridomas were generated and cloned according to standard procedures (Celis et al., 1994). The CatA-specific monoclonal antibody D40-3 was raised against a recombinant protein representing the N-terminal half of CatA (Schwienbacher, 2005).

Immunofluorescence

Hyphae or germlings grown on glass cover slips in AMM at 30 °C were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS and washed twice with PBS. For cell wall digestion, samples were incubated in 300 µl PBS containing 60 mg bovine serum albumin and 6 mg lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma) for 1 h at 37 °C. Treated cells were then permeabilized using 0.5 ml 0.2% Triton X-100 in PBS (1 min at RT) and subsequently blocked with 2% goat serum/PBS for 1 h. After 3 washing steps with PBS, samples were incubated with the primary antibody in a humid chamber for 30 min and washed 3 times with PBS. Bound antibodies were stained using Cy3-labelled anti-mouse immunoglobulin (Dianova, Hamburg, Germany). After another 3 washes with PBS, samples were mounted with Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame,

California, USA) and analyzed using a Leica SP5 confocal scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Protein extraction and western blot

For protein extractions from resting conidia, 75-cm² flasks containing YG agar were inoculated with Afs35 conidia and grown at 37 °C for 3 days. Conidia were harvested in sterile water, and the pellet was frozen overnight at –80 °C and lyophilized. The resulting dry material was ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen. The ground powder was resuspended in sample buffer (2% [w/v] SDS, 5% [v/v] mercaptoethanol, 60 mM Tris/Cl pH 6.8, 10% [v/v] glycerol, 0.02 [w/v] bromophenol blue), heated at 94 °C and immediately extracted twice using a Fast Prep 24 device (M.P. Biomedical, Irvine, CA) (speed: 6.5 m/s for 35 s), followed by a final heat denaturation at 94 °C for 5 min. Samples were separated on 12% SDS gel, blotted onto nitrocellulose membranes, and finally stained with the appropriate primary and alkaline phosphatase-labelled secondary antibodies.

For protein extractions from hyphae, 4 × 10⁷ resting conidia were inoculated in 20 ml AMM and incubated over night at 37 °C. Proteins were extracted and analyzed as described above. The histidine hepta-peptide motif in the non-spliced HexA polypeptide was detected using the His-Tag antibody #2365 from CellSignaling Technology (Danvers, MA 01923, USA).

Construction of strains expressing fluorescent fusion proteins

In order to fuse the PTS1 signal from HexA to the C terminus of the red fluorescent protein, the *rfp* gene was amplified using gpda-5'-NsiI and RFP-3'-PTS1. The core *hexA* gene was amplified using HexA-short-5'-Bsp1407I (GCG TGT ACA ATG GGT TAC TAC GAC GAC) and HexA-3' (TTA CAG ACG GGA ACC GTG GAT GAC CTT). The PCR product was digested, cloned into the pSK379 backbone, and introduced into *A. fumigatus* Afs35 using protoplast transformation. The strain expressing cytosolic RFP was generated using a derivative of pSK379 containing the *rfp* gene under the control of the *gpda* promoter.

Live-cell imaging

To visualize the effects of fludioxonil on germ tubes, resting conidia of a derivative of strain Afs35 expressing cytoplasmic RFP were inoculated in 8-well ibidi-chambers (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) containing 300 µl AMM. Germ tubes were generated by overnight incubation at 30 °C. Fungal cells of the appropriate length were treated with 1 µg/ml fludioxonil for 4 h as described previously (McCormick et al., 2012). Samples were subsequently analyzed at 37 °C using a Leica SP-5 microscope equipped with an environmental chamber adjusted to 37 °C (Leica Microsystems).

Results

The *hexA* locus of *A. fumigatus*

The data base entries for the Hex-1 protein of *N. crassa* (acc. no. P87252) and the HexA protein of *A. fumigatus* AFUA_5G08830 show a substantial difference in their molecular weights, being 19.1 kDa for Hex-1 and 61 kDa for HexA. Searching for homologues in other *Aspergillus* species also revealed substantial differences: the predicted HexA proteins of the pathogenic species *A. terreus* (ATET_06581) and *A. fumigatus* are substantially larger (~60 kDa) than their homologues in *A. oryzae* (AO090020000450) and *A. nidulans* (ANIA_04695) (~20 kDa). Larger HexA homologues are also predicted in other pathogenic fungi, e.g. *Penicillium marneffei* and *Coccidioides posadasii*. An alignment of the HexA protein sequences

Af	MYSVESKFERDSRRDAQRTANLDFDARVPIPFVFPSSYRSDAVPETTLT---RVEGEVN	57
An	-----	
Ao	-----	
At	-----MEFERHSRRDAQRTANLDFDARVPIPFVFPSSYRSDAVPETTLTATERVEGEVN	55
Af	LDRTSHVEREDTRTSAPLPDPRVYGREEVDIHISKDR LHAPS RKGDDFQVIYEDRAHKDS	117
An	-----	
Ao	-----	
At	LDRTSHVEREDTRTSARLPDPRVYGKEEVDIHIERDSRRPLP--QHDQQFAYSQERVQSA	113
Af	RVPEVELSRERWKRSENNAKQNKNNNTSTRSGDVLKAVSAKKVAPQAQTRADEKASYQ	177
An	-----	
Ao	-----	
At	RYPEVDLARER-----	124
Af	LTQKARYRESTSRYEPLPKPVYDQALESQLDITEREYRRRT-DPTYDVNLSYGRHQAPV	236
An	-----	
Ao	-----	
At	-----YREPSVRVH--DRQQVYDQALESQLDVTEREYRRRVNQPTYDVNTYDRSYQAPV	176
Af	DSYQAYQPQQTSDVSLHRSKTEIDVSYDKAYTPKPLETRKGSFSRSELTVESVPSRPSS	296
An	-----	
Ao	-----	
At	EYASARQYTAD---VYGSPKADLDVSYDRAYQPQPVEAYRG-----SAPRSLNVEPV	225
Af	ASSISQVKVLKPYTAIDQPPARKMGYYDDGNYHSFRRGVERAVDRITHPF---HHHHHH	353
An	-----MGYYDDD-----	7
Ao	-----MGYYDDD-----	7
At	SPATSNVKVLKTS TVVDQPPARKMGYYDDGNYHSFRRGVERAADRI LHPFDHQHHHHHH	285

Af	HDREEVVIADERGFPVRYRDGVREDVRIVEPR-ASKTTAESVPIPCHFIRIGDILILQGRP	412
An	-----VRYRDGVKENVRIVEPRGAAATTSETVPIPTHFIRVGDILVLQGRP	53
Ao	-----VS-----RDGAHHAVRVVEPRSSGRSADTVPIPCNFIRIGDILILQGRP	52
At	SDREEVVADERGFPVRYRDGVREDVRIVEPR--GGATAETVPIPCHFVIRIGDILILQGRP	343
	.:. *: . :.:*** :*:***:*****	
Af	CQVIRISVSPQTGQHRYLGVDLFTRLQLEESSFVSNPSPSVVVQTM LGP VYKTYRILDLH	472
An	CQVIRISSPMTDQRRYTGVDLFTRELHEESSFVSNPKPSVVVQTM LGP VYKTYRILDIQ	113
Ao	CQVIRISVSPQTGQHRYLGVDLFTRLQLEESSFVSNPSPSVVVQTM LGP VYKTYRILDIR	112
At	CQVIRISVSPQTGQHRYLGVDLFTRLQLEESSFVSNPSPSVVVQTM LGP VYKTYRILDLR	403
	***** ** *.*:** *****:*.*****.*****:*****:..	
Af	EDGTITAMTETGDVKQALPVVTQGQLFRKIRDAFSEGRGSVRALVINDGGRELVDYKVI	532
An	EG-TIVALTESGDVKSGIPVIPQGNLYQRIKDAFLEGRGSVRALVINDGGRELVDYKII	172
Ao	DN-QIVAMTETGDVKQGIPVVPQGELFSKIAAFEDGHGSVRALVINDGGRELVDYKVI	171
At	DDGKIVAMTETGDVKQGLPVVPQGHLFRRIREAFEEGRGSVRALVINDGGRELVDYKVI	463
	:. *.*:***:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*:..*	
Af	HGSRL	537
An	HSSRL	177
Ao	QSSRL	176
At	HASRL	468
	:.***	

Fig. 1. Alignment of the Hex-1-like protein sequences of *A. fumigatus* AFUA.5G08830 (XP.753754) (Af), *A. nidulans* ANIA.04695 (XP.662299.1) (An), *A. oryzae* AO090020000450 (XP.001824768.2) (Ao), and *A. terreus* ATET.06581 (XP.001215759.1) (At). Identical residues are indicated by asterisks.

of the 4 *Aspergillus* species mentioned above is shown in Fig. 1. It demonstrates that the difference in size is due to a large N-terminal extension predicted only for *A. fumigatus* and *A. terreus*. All 4 *Aspergillus* sequences are highly homologous in their last C-terminal 220 amino acids that include a C-terminal peroxisomal targeting signal (PTS1). In *A. oryzae*, 2 Hex-1 proteins of 19 and 24 kDa exist due to a differential splicing of the corresponding gene (Maruyama et al., 2005). A similar intron is also predicted for *A. nidulans* ANIA.04695, but not for *A. terreus* ATET.06581 or *A. fumigatus* AFUA.5G08830.

Specific monoclonal antibodies reveal dominant HexA-protein species of 25 kDa and 20 kDa

To analyze HexA at the protein level, we have raised antibodies to a His-tagged protein that comprises the complete fourth exon of AFUA.5G08830. After immunization of mice, several monoclonal antibodies (mabs) were obtained that specifically recognized the recombinant protein (Fig. 2A, lane b). In immunoblots of *A. fumigatus* hyphal extracts, we identified 2 classes of mabs with distinct patterns represented by the mabs Y157 and Y191. Y157 detected

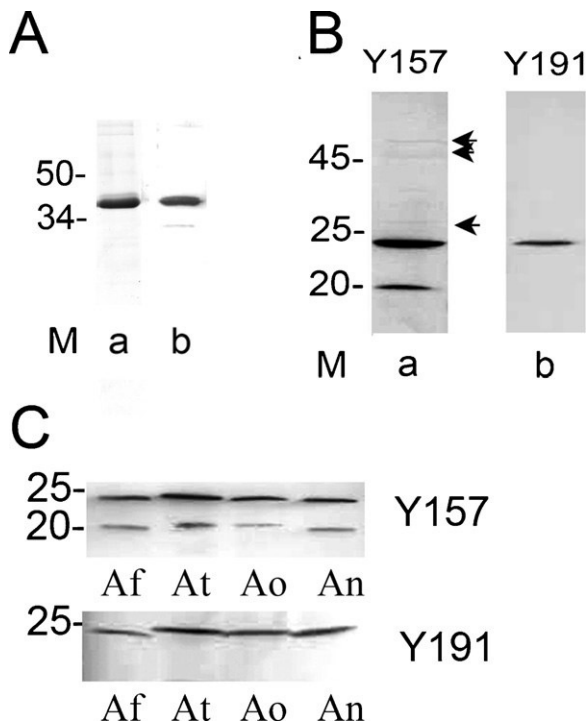


Fig. 2. Generation and application of HexA-specific monoclonal antibodies. Panel A: A His₆-protein corresponding to the complete fourth exon of AFUA_5G08830 was expressed in *E. coli* and purified. Lane a: Coomassie staining of the purified recombinant protein; lane b: immunoblot using mab Y157. Panel B: Immunoblot analysis of protein extracts of *A. fumigatus* strain AfS35 using the HexA-specific mabs Y157 (lane a) and Y191 (lane b). Panel C: Immunoblot analysis of protein extracts from *A. fumigatus* strain D141 (Af), *A. terreus* strain NIH2624 (At), *A. oryzae* strain DSM1862 (Ao), and *A. nidulans* strain A26 (An) stained with Y157 and Y191. Positions of selected molecular weight markers are indicated in kDa.

2 prominent HexA polypeptides of approximately 20 and 25 kDa (Fig. 2B, lane a), while only the major 25-kDa HexA band was recognized by Y191 (Fig. 2B, lane b). In addition, faint bands of higher molecular weights were also detectable (Fig. 2B, arrows). Further immunoblots with hyphal extracts from *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, and *A. nidulans* revealed very similar patterns for all 4 species with a dominant HexA species of approximately 25 kDa and a second band of approximately 20 kDa (Fig. 2C). Thus, our data demonstrate that the major HexA protein species are similar in size in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species.

In *A. oryzae*, 2 protein species of 19 and 24 kDa have been described and were shown to arise from an alternative splicing of the *hex1* gene (Juvvadi et al., 2007). The stretch of 50 amino acids that is missing in the smaller polypeptide comprises a prominent histidine hexa-peptide in *A. oryzae*, and this motif is conserved as a histidine hepta-peptide in *A. fumigatus* (Supplementary Fig. 1C). The epitope of monoclonal antibody Y191 resides within the spliced segment, but Y191 shows no cross-reactivity with other recombinant His-tagged proteins, suggesting that it is not reactive with the poly-histidine motif (data not shown). However, a commercially available anti-His-tag antibody recognizes the 25-kDa, but not the 20-kDa form of HexA (Supplementary Fig. 1A, lane A'), suggesting that similar splicing patterns exist for the *hex* genes in *A. fumigatus* and *A. oryzae*. To prove this, we amplified the *hexA* gene from *A. fumigatus* chromosomal and cDNA. A product of approximately 660 bp was obtained with chromosomal and cDNA, whereas a second smaller amplicon of approximately 500 bp turned out to be specific for cDNA (Supplementary Fig. 1B, lanes A and B). Sequencing of the smaller PCR product revealed an intron as it has been reported previously for the *A. oryzae hex1* (Supplementary Fig. 1C).

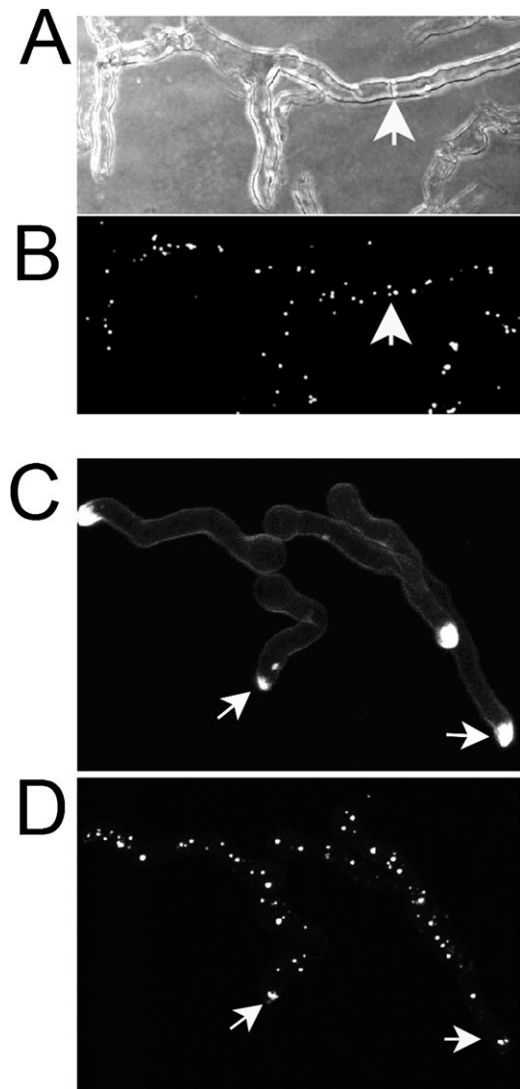


Fig. 3. Localization of HexA using mabs and GFP fusion proteins. Panels A and B: Hyphae of the *A. fumigatus* strain AfS35 were fixed, digested, and stained with mab Y191 and a Cy3-labelled secondary antibody. A: Bright field image; B: Immunofluorescence. The position of a septum is indicated by an arrow in A and B. Panel C shows viable hyphae of strain AfS35 expressing GFP-HexA (panel D) that were stained with Calcofluor White (panel C). Hyphal tips are indicated by arrows. A single optical plane is shown in A, while projections of stacks are shown in B to D.

The majority of the Woronin bodies are not associated with the cell wall

All studies published so far on the localization of Hex proteins relied on GFP fusion proteins. Using the HexA-specific mabs, we were able to detect HexA directly in immunofluorescence. Both mabs, Y191 and Y157, recognized HexA in distinct organelles (Fig. 3B). No difference was evident between the patterns obtained with the 2 antibodies (data not shown). Woronin bodies were found in close proximity to all septal pores, but the majority of these organelles was distributed throughout the cytoplasm and apparently not associated with the cell wall.

For live-cell imaging, we have generated an *A. fumigatus* strain expressing GFP fused to the N terminus of the last 218 amino acids of AFUA_5G08830 starting with the MGYDDDD motif that is highly conserved in all *Aspergillus* sequences (cf. Fig. 1). When expressed in AfS35, GFP-HexA showed the characteristic localization pattern found with the HexA-specific mabs (cf. Fig. 3B and D). No particular enrichment of Woronin bodies towards the

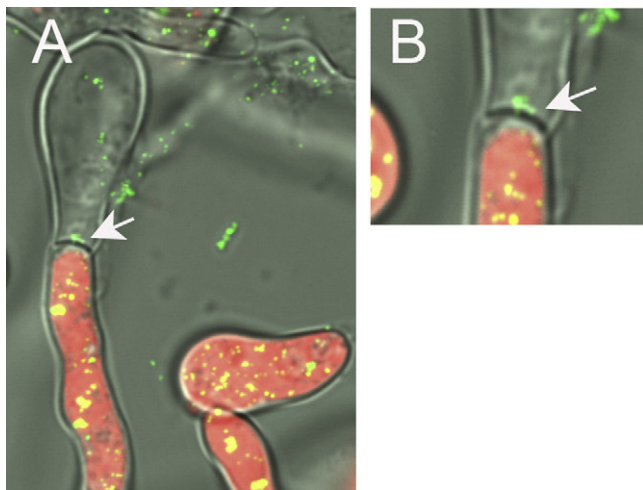


Fig. 4. Woronin bodies seal septal pores in *A. fumigatus*. The *A. fumigatus* strain AfS35 expressing cytosolic RFP (red) and GFP-HexA (green) were treated with 1 μ g/ml fludioxonil. This results in massive swelling, local cell wall damage, and lysis. Empty compartments lack cytosolic RFP. The arrows in A and B indicate a sealed septal pore and the corresponding Woronin body. An enlargement of this region is shown in panel B. Note the Woronin bodies that have been released to the medium. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

hyphal tip was apparent, but small clusters were often found at the apex of germ tubes, a region also intensively stained by Calcofluor White (Fig. 3D and C, arrows). Double fluorescence microscopy using the GFP-HexA and immunofluorescence revealed a perfect co-localization of the GFP-HexA- and HexA-specific signals (data not shown). In the proximity of the septal pore, Woronin bodies showed only a very restricted mobility (Supplementary Video 1), whereas all other Woronin bodies are highly dynamic and motile (Supplementary Video 2).

The primary role of Woronin bodies is to plug septal pores in case of local injury. We used the fungicide fludioxonil to induce local damage and subsequent lysis. Fludioxonil activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway leading to swelling and frequent tip bursting (McCormick et al., 2012). Fig. 4 shows *A. fumigatus* hyphae expressing cytosolic RFP and GFP-HexA that were treated with fludioxonil. Woronin bodies were found at septal pores separating intact and empty compartments (Fig. 4, arrows), which clearly demonstrates their capacity to close septal pores.

Detection of HexA and Woronin bodies in resting *A. fumigatus* conidia

Although Woronin bodies are primarily required in hyphae, we were able to detect the 25-kDa and 20-kDa HexA species in protein extracts of resting *A. fumigatus* conidia (Fig. 5E). Conidia harbouring *gfp-hexA* under the control of the constitutive *gpdA* promoter showed GFP-positive structures that resemble hyphal Woronin bodies. Remarkably, nearly all of these organelles seemed to be associated with peroxisomes (Fig. 5D).

Woronin bodies and peroxisomes

In *N. crassa*, Woronin bodies were shown to originate from peroxisomes (Liu et al., 2008). To analyze whether the same is true for *A. fumigatus*, we fused the putative peroxisomal targeting sequence of HexA (GGRELVDYKVIHGSRL) to the C terminus of the red fluorescent protein (RFP). Expression of this construct resulted in distinct and relatively large fluorescent organelles (Supplementary Video 2). The number of peroxisomes increases when *Aspergillus* is grown

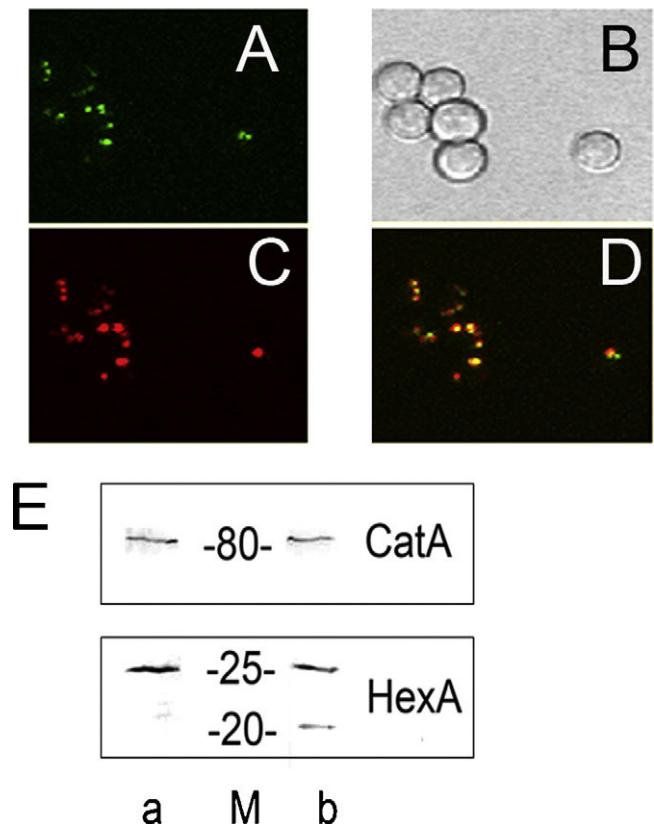


Fig. 5. Detection of HexA in resting *A. fumigatus* conidia. Panels A–D: Images show resting conidia of strain AfS35 expressing HexA-GFP (green) and RFP-PTS1 (red). Panel E: Immunoblots of protein extracts from resting conidia of AfS35 were analyzed using the HexA-specific mabs Y191 (lane a), Y157 (lane b), and, as a control, with mab D40-3 that recognizes the conidia-specific catalase CatA. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

on lipids (Valenciano et al., 1996). Accordingly, the organelles targeted by RFP-PTS1 were much more abundant during growth on minimal medium supplemented with oleate as sole carbon source (Fig. 6A–D).

Interestingly, RFP-PTS1 was never found in Woronin bodies demonstrating an efficient sorting mechanism that allows the import of RFP-PTS1 into peroxisomes, but excludes this protein from the nascent Woronin bodies. Apart from mature peroxisomes and Woronin bodies, we also frequently observed ‘tandem organelles’ consisting of a Woronin body and a peroxisome. This tight association of both organelles is most likely due to an incomplete budding process. Based on electron-microscopic data from *A. nidulans*, it was assumed that Woronin bodies develop primarily at the hyphal tip region and subsequently migrate to newly formed septa (Momany et al., 2002). The observed tandem organelles represent an early step in the genesis of Woronin bodies; one would therefore expect to find them preferentially at the hyphal apex. However, this seems to be not true for *A. fumigatus*, as such tandem organelles can be found in the whole cytoplasm. Surprisingly, we detected them also at septal pores (Fig. 7A–D, arrows) suggesting that they are more persistent than expected and most likely functional.

As mentioned above, Woronin bodies are not particularly enriched at the apical tip of *A. fumigatus* hyphae. However, we frequently observed a small cluster of these organelles near the apical tip. Double labelling of peroxisomes and Woronin bodies revealed that these apical Woronin bodies are mature and not associated with peroxisomes (Fig. 6E–H); their position resembles that of the

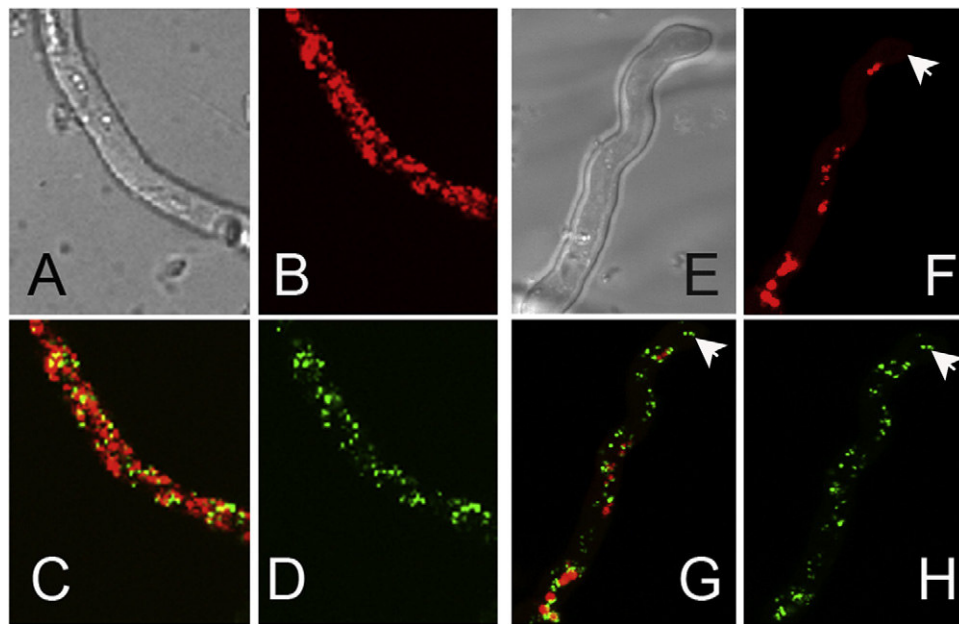


Fig. 6. Detection of peroxisomes (red) and GFP-HexA (green) in hyphae of strain AfS35 grown with oleate (A–D) or glucose (E–H) as sole carbon source. Note the dramatic increase of peroxisomes in hyphae grown on oleate that is not accompanied by a comparable increase in the number of Woronin bodies. Arrows in F to H indicate apical cluster of Woronin bodies that is not associated with peroxisomes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Spitzenkörper, an apical vesicle cluster that is the organizing centre for hyphal growth and morphogenesis (Harris, 2006).

Discussion

The hyphal organization provides substantial advantages to filamentous Ascomycetes, but the septal pore is also a potential Achilles' heel. The structure of the septum therefore has to be a compromise between the advantage of exchange between compartments and the potential threat emanating from local damage. Due to the high internal osmotic pressure, even small injuries can be fatal for the whole mycelium. Woronin bodies have evolved in the Ascomycetes to prevent excessive cytoplasmic bleeding. In the absence of stress, they have to be positioned in a way not obstructing the cytoplasmic exchange through the septal pore. In case of injury, they have to rapidly close and seal the pore. Accordingly, they are compact, electron-dense organelles of sufficient size and rigidity to function as a plug.

A major step towards a molecular understanding of Woronin bodies was the identification of the Hex-1 protein as its major constituent. Hex-1 was shown to be targeted to peroxisomes where it assembles into the compact core structure (Jedd and Chua, 2000; Tenney et al., 2000; Yuan et al., 2003). This pioneering work was done in *N. crassa*, a model organism for filamentous fungi. In our work, we are particularly interested in *A. fumigatus*, a pathogen causing severe and life-threatening infections in immunocompromised patients. At particular risk are neutropenic patients or patients with defects in the microbicidal capacity of their phagocytes (McCormick et al., 2010). This underlines the crucial role of neutrophils that are unique in their ability to attack hyphae that are too big to be eliminated by phagocytosis. Neutrophils bind to hyphae and attack the fungal cell wall by releasing aggressive molecules from their granula. Even an impaired innate immune response retains a residual capacity to cause local cell wall damage, and this prompted us to initiate this study on the role of Woronin bodies in *A. fumigatus*.

Homologues of Hex-1 are predicted in many fungal genomes. The Hex-1 protein in *N. crassa* has a molecular weight of 19 kDa

(Jedd and Chua, 2000; Tenney et al., 2000), but other Hex proteins are predicted to be substantially larger. In *Aspergillus*, the HexA proteins of the pathogenic species *A. fumigatus* and *A. terreus* fall into this category, whereas their homologues in the non- or weakly pathogenic species *A. nidulans* and *A. oryzae* resemble *N. crassa* Hex-1. We have raised mabs to a recombinant protein corresponding to the 355 C-terminal amino acids of AFUA_5G08830. These antibodies detected a prominent 25-kDa band in protein extracts of *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, and *A. terreus*, and some of them recognized an additional band of 20 kDa. Thus, we provide experimental proof that the size of the major HexA protein species in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species is similar and that the differences predicted by the automatic gene annotation in the genome sequences of the different *Aspergillus* species do not exist. However, our data do not exclude that minor amounts of a 60-kDa *A. fumigatus* HexA polypeptide may exist and have a distinct function. The occurrence of 2 dominant HexA species in the range of 20–25 kDa has been reported for *A. oryzae* and *M. grisea* and was shown to originate from differential splicing (Juvvadi et al., 2007; Soundararajana et al., 2004). The fact that mab Y191 does not recognize the 20-kDa form of HexA suggests that its epitope is lost in the smaller splice variant.

It is known that Woronin bodies differ in size and localization between the model fungus *N. crassa* and most other Ascomycetes. *N. crassa* is a fast growing fungus that lacks Woronin bodies that are directly associated with the septal pore, a feature found in many other fungi. Instead, Woronin bodies in *Neurospora* are anchored at the cell wall by a large tether protein called LAH-1, which is part of the so-called leashin locus (Ng et al., 2009). It is assumed that *N. crassa* developed this architecture to permit a fast flow of cytoplasm through the pore that enables the rapid growth of this fungus (Ng et al., 2009). Interestingly, a LAH-1 homologue does not exist in *A. fumigatus*.

In this study, we used a GFP-HexA fusion protein and HexA-specific monoclonal antibodies to localize HexA in *A. fumigatus*. We detected some Woronin bodies in close proximity to septal pores, but the majority was distributed throughout the cytoplasm. In *Aspergillus*, a fast cytoplasmic flow occurs only in damaged hyphae.

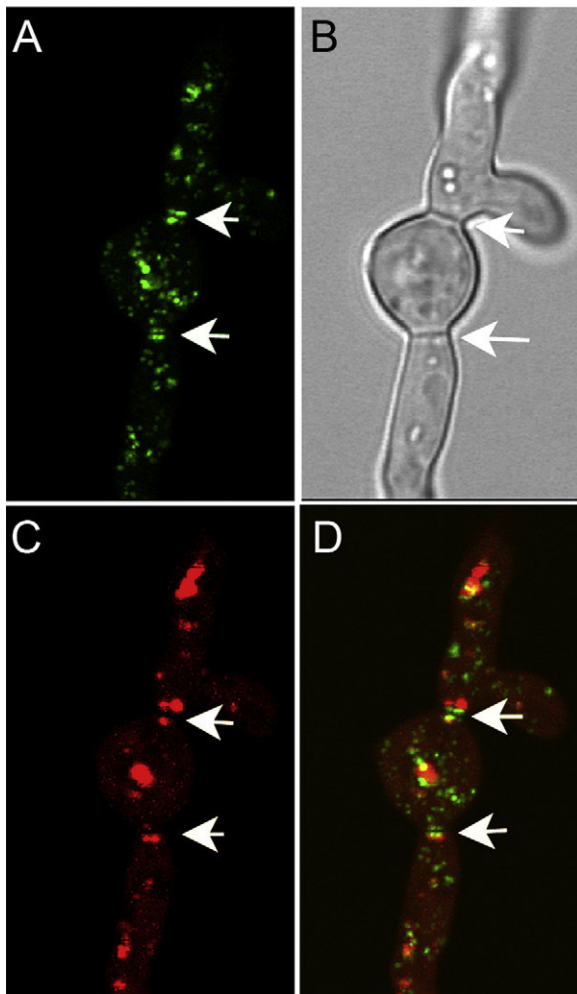


Fig. 7. Co-localization of Woronin bodies and peroxisomes. Images of Afs35 hyphae expressing HexA-GFP-long (green) and RFP-PTS1 (red) grown in AMM. The positions of 2 septa are indicated by arrows. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

In intact hyphae, septum-associated Woronin bodies restrict the flow due to their presence at the pore opening and immediately plug the pore in case of an increased flow that indicates cellular damage. Live cell microscopy revealed that the Woronin bodies found at the pores of *A. fumigatus* are tightly anchored, which is in line with observations in other fungi. In contrast, cytoplasmic Woronin bodies are dynamic in *A. fumigatus* and clearly not bound to the cell wall. Free and motile Woronin bodies in the cytoplasm can only appear in the absence of a rapid cytoplasmic flow. In fungi with a fast cytoplasmic flow, such as *N. crassa*, unbound Woronin bodies would immediately block the pore. Although such motile Woronin bodies are abundant in *A. fumigatus*, their function in the hyphal architecture remains unclear.

In *A. nidulans*, Woronin bodies were found to be enriched in the apical region of germ tubes, and it is assumed that they are transported from the apex to more basal regions of the cell where new septa are formed (Momany et al., 2002). Hex-1 harbours a C-terminal peroxisomal targeting sequence that guides the protein to peroxisomes, where Woronin bodies are formed and arise from a distinct budding process (Liu et al., 2008). In *A. fumigatus*, we found no particular enrichment of Woronin bodies in the apical compartment of germ tubes or hyphae. Only small clusters are commonly found at the tip. Nascent Woronin bodies assemble at the peroxisomal membrane, and peroxisomes with attached Woronin

bodies were frequently found in *A. fumigatus*. Interestingly, such tandem organelles were rarely found at the tip, but surprisingly often at septal pores suggesting that they are long-lived and functional. Growth on oleate as sole carbon source led to a dramatic increase in the number of peroxisomes, whereas the number of Woronin bodies increased only moderately. This suggests that the dramatic increase in the number of peroxisomes is not accompanied by a comparable increase in the expression level of HexA. One possible consequence is a smaller load of HexA per organelle, another that HexA is only targeted to a certain subset of peroxisomes to ensure normal formation of Woronin bodies. Our data support the latter scenario, since Woronin bodies in hyphae grown on glucose or oleate seemed to be comparable in size and number.

We detected Woronin bodies and HexA not only in hyphae, but also in resting conidia, which suggests an important function during germination. During outgrowth of the germ tube, some Woronin bodies migrate into the emerging tubular extension, but many remain in the conidial body. Whether these organelles are exclusively dedicated to plug septal pores or whether they have additional functions remains to be determined.

The ability of fungi to close septal pores is a fascinating cell biological process that we are just beginning to understand. In this study, we provide first data on the expression and localization of HexA in *A. fumigatus*. An ongoing study is aimed to define the importance of these organelles for the stress resistance and virulence of this important human pathogen.

Acknowledgements

We thank Sweta Samantaray and Johannes Wagener for kindly providing cDNA, Marzena Broniszewska for excellent technical assistance, and Kirsten Niebuhr for critical reading of the manuscript. This project was supported by a grant from the Wilhelm-Sander-Stiftung, Munich, Germany.

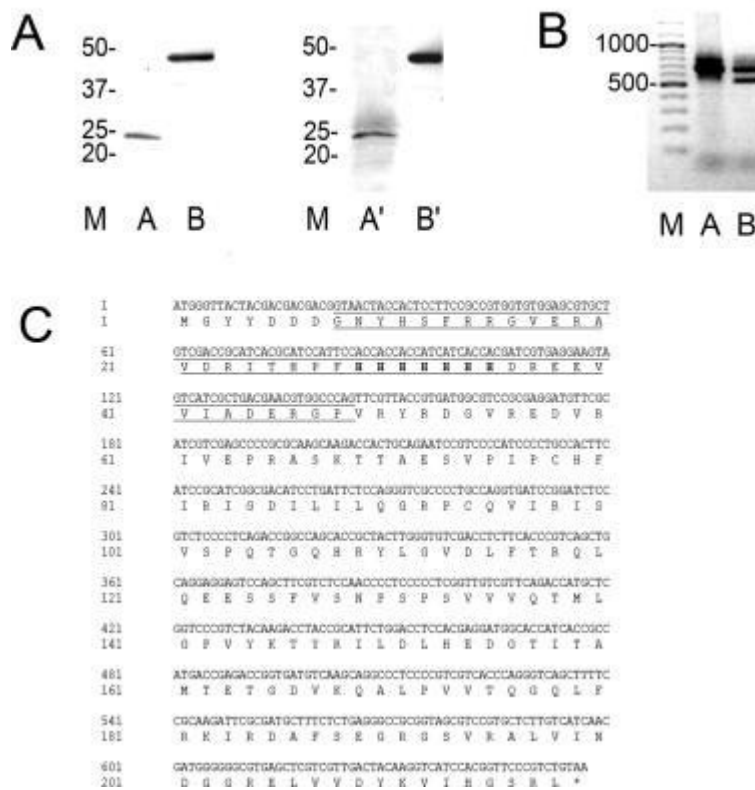
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.11.005>.

References

- Celis, A., Dejgaard, K., Celis, J.E., 1994. Production of mouse monoclonal antibodies. In: Celis, J.E. (Ed.), Cell Biology, Vol. II. Academic Press, London.
- Collinge, A.J., Markham, P., 1985. Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. Exp. Mycol. 9, 80–95.
- Harris, S.D., 2006. Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. Int. Rev. Cytol. 251, 41–77.
- Jedd, G., Chua, N.H., 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. Nat. Cell Biol. 2, 226–231.
- Juvvadi, P.R., Maruyama, J., Kitamoto, K., 2007. Phosphorylation of the *Aspergillus oryzae* Woronin body protein, AoHex1, by protein kinase C: evidence for its role in the multimerization and proper localization of the Woronin body protein. Biochem. J. 405, 533–540.
- Kotz, A., Wagener, J., Engel, J., Routier, F.H., Echtenacher, B., Jacobsen, I., Heesemann, J., Ebel, F., 2010. Approaching the secrets of N-glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: characterization of the AfOch1 protein. PLoS One 5, e15729.
- Krappmann, S., Sasse, C., Braus, G.H., 2006. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. Eukaryot. Cell 5, 212–215.
- Liu, F., Ng, S.K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., Jedd, G., 2008. Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. J. Cell Biol. 180, 325–339.
- Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Ishi, K., Kitamoto, K., 2005. Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331, 1081–1088.
- McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F., 2010. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cell. Microbiol. 12, 1535–1543.

- McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2012. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7, e38262.
- Momany, M., Richardson, E.A., Van Sickle, C., Jedd, G., 2002. Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia* 94, 260–266.
- Ng, S.K., Liu, F., Lai, J., Low, W., Jedd, G., 2009. A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS Genet.* 5, e1000521.
- Reichle, R.E., Alexander, J.V., 1965. Multiperforate septations. Woronin bodies, and septal plugs in *Fusarium*. *J. Cell Biol.* 24, 489–496.
- Schwiebächer, M., 2005. Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden, PhD thesis. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany (in German).
- Soundararajana, S., Jedd, G., Lia, X., Ramos-Pamplona, M., Chuah, N.H., Naqvia, N.I., 2004. Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *Plant Cell* 16, 1564–1574.
- Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J.I., McClain, C., Bowman, E.J., Bowman, B.J., 2000. Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genet. Biol.* 31, 205–217.
- Valenciano, S., Lucas, J.R., Pedregosa, A., Monistrol, I.F., Laborda, F., 1996. Induction of beta-oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 166, 336–341.
- Woronin, M., 1864. Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pucherrimus* Cr. und einiger Pezizen. *Abh. Senkenb. Naturforsch.* 5, 344–355 (in German).
- Yuan, P., Jedd, G., Kumaran, D., Swaminathan, S., Shio, H., Hewitt, D., Chua, N.H., Swaminathan, K., 2003. A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*. *Nat. Struct. Biol.* 10, 264–270.



Analysis of the splice variants of *A. fumigatus* hexA. Panel A: Hyphal protein extract of strain AfS35 (A and A') and recombinant His-tagged HexA protein (B and B') were separated by SDS-PAGE, blotted, and stained with the HexA-specific mab Y191 (A and B) and a His-tag-specific antibody (A' and B'). Note that both monoclonal antibodies recognize the 25 kDa, but not the 20 kDa form of HexA. Marker proteins are indicated in kDa (lane M). Panel B: The core hexA gene was amplified from chromosomal and cDNA. Note the smaller splice variant of approximately 500 bp that is specific for cDNA. Panel C: Sequencing of the smaller hexA transcript. The introns sequence and the corresponding amino acids are underlined. The histidine hepta-peptide motif is indicated in bold.

- 2.3 Beck, J., Echtenacher, B., Ebel, F., 2013c. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. Mol Microbiol. 89 (5), 857-871.



Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous *Ascomycota*

Julia Beck,¹ Bernd Echtenacher² and Frank Ebel^{1,3*}

¹Max-von-Pettenkofer-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

²Institute for Immunology, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

³German Center for Infection Research (DZIF), Munich, Germany.

Summary

Hyphae of filamentous *Ascomycota* consist of compartments that are connected via septal pores. To avoid a dramatic loss of cellular content after wounding, fungi developed mechanisms to occlude their septal pores. In most *Pezizomycotina*, so-called Woronin bodies are anchored in proximity to the pore. This is a prominent example for precise spatial positioning of organelles, but so far the underlying molecular organization has remained largely unknown. Using the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*, we provide evidence that Woronin bodies are important for stress resistance and virulence. Furthermore the molecular machinery anchoring them at the septum is described. Namely, we have identified Lah as the tethering protein and provide evidence that the Woronin body protein HexA binds to the septal pore in a Lah-dependent manner. Moreover, we demonstrate that a striking poly-histidine motif targets HexA to the septal cell wall. Thus, the axis HexA-Lah is an excellent candidate for the tether linking Woronin bodies to the septum. This model applies to *A. fumigatus*, but most likely also to the vast majority of the *Pezizomycotina*. Our findings shed light on the evolution of Woronin body anchoring and provide a basis for the development of novel strategies to combat fungal pathogens like *A. fumigatus*.

Introduction

Aspergillus fumigatus is the major cause of invasive aspergillosis, a life-threatening, systemic infection that mainly affects severely immunocompromised patients (Latgé, 1999). The high lethality rate of this disease reflects shortcomings in diagnostics and therapy. The arsenal of anti-fungal agents that are effective against *Aspergillus* is limited and, recently, evidence for spreading of resistance has been reported (Verweij *et al.*, 2012). Given this situation, the identification of new therapeutic targets is an urgent need. Up to now, all agents target the cellular integrity of the fungus. However, alternative strategies should be considered that weaken the hardness of the pathogen. It is therefore of particular interest to identify molecules or structures that are crucial for the stress resistance of *A. fumigatus*.

Multicellular organisms have evolved in the kingdoms of animals, plants and fungi. The control of cell-to-cell contacts is an essential element in the organization of these organisms and each of them had to find its individual balance between the benefit of inter-cellular exchange and the need for compartmentalization, e.g. to allow cellular differentiation. For this purpose, different kinds of tightly controlled cell-to-cell channels have evolved. Fungal hyphae are multicellular structures that are encased by a rigid cell wall that protects them from an often hostile environment. Septa are specialized parts of the cell wall that partition the hyphal body into compartments that remain connected via septal pores to facilitate the exchange of molecules and even organelles (Beck *et al.*, 2013).

During *Aspergillus* infection, hyphae represent the most important morphotype. Due to their apical growth hyphae promote infection by active tissue invasion and penetration of host barriers. They are also too big to be eliminated by phagocytosis, thereby confronting the immune response with a serious challenge (Brakhage *et al.*, 2010). Neutrophils and NK cells have the unique capacity to attack hyphae by the release of aggressive molecules (Diamond *et al.*, 1978; Bouzani *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2011) and pronounced neutropenia is a major risk factor for the development of invasive aspergillosis (McCormick *et al.*,

Accepted 28 June, 2013. *For correspondence. E-mail ebel@mvp.uni-muenchen.de; Tel. (+49) 89 2180 72863; Fax (+49) 89 5160 5223.

2010). Thus, cellular leakage is likely to occur frequently during infection even in an immunocompromised host.

The coenocytic organization of hyphae is clearly advantageous and a characteristic element in the architecture of filamentous fungi, but it also renders them more vulnerable. To reduce this threat, most filamentous fungi have developed specialized organelles to occlude septal pores. *Aspergillus* belongs to the *Pezizomycotina*, the largest subphylum of the *Ascomycota* comprising more than 32 000 species (Kirk *et al.*, 2001). The septal pores of these fungi are controlled by Woronin bodies (Woronin, 1864), specialized organelles of peroxisomal origin (Jedd and Chua, 2000) that in most *Pezizomycotina* are directly anchored at the septal pore. In these fungi, a directed cytoplasmic flow occurs only after cellular leakage and then activates a mechanism that immediately seals neighbouring pores (Collinge and Markham, 1985; Plamann, 2009). Interestingly, it was recently shown for *Aspergillus oryzae* that septa can also be closed in intact hyphae, which provides a mean to control intra-hyphal transport and to establish hyphal heterogeneity and differentiation (Bleichrodt *et al.*, 2012).

The ability to occlude septal pores and to thereby control the cell-to-cell transport within hyphae is crucial for filamentous *Ascomycota*, and mutants lacking functional Woronin bodies show an impaired stress resistance and a dramatically reduced ability to survive wounding (Jedd and Chua, 2000; Soundararajana *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2005). So far, the importance of these organelles for the pathogenicity of filamentous fungi has only been addressed for the plant pathogen *Magnaporthe grisea*. Here, a *hex* mutant showed an impaired invasive capacity and a reduced survival in infected host tissue (Soundararajana *et al.*, 2004). During infection of mammals, filamentous fungal pathogens, like *A. fumigatus*, are attacked by immune cells and humoral factors. It is therefore conceivable that the ability to prevent cellular bleeding after wounding is an important piece in the mosaic of traits making *A. fumigatus* a successful pathogen.

From the cell biology point of view, positioning of the Woronin body at the septal pore is a fascinating mechanism that has to fulfil specific requirements. A certain distance to the pore opening is necessary to avoid constraints in the exchange between neighbouring compartments. Manipulation of Woronin bodies with laser tweezers revealed the existence of an elastic tether connecting Woronin bodies to the septum (Berns *et al.*, 1992). After wounding, the resulting cytoplasmic flow has to be able to force nearby Woronin bodies into the pore opening, which requires a precise positioning and a sufficient flexibility of the tether. In *Neurospora crassa*, LAH-1 was recently identified as a giant tethering protein that binds to the cell cortex and the WSC protein on the Woronin body surface (Ng *et al.*, 2009). The positioning of Woronin bodies at the

lateral cell wall permits the unusual fast cytoplasmic flow that is characteristic for the *Neurospora–Sordaria* clade (Lew, 2005). However, this clade is small and by far not representative for all *Ascomycota*. In fact, *Neurospora* appears to harbour a curious modification of the tethering mechanism that evolved to fulfil the specific requirements of a small group of fungal species that diverged from the rest of the *Ascomycota* (Plamann, 2009).

In this study we have analysed *A. fumigatus*, a pathogenic fungus that represents the common architecture of Woronin bodies positioning in the *Ascomycota* (Momany *et al.*, 2002; Beck and Ebel, 2013). We found that Woronin bodies are required for full stress resistance and virulence. Moreover, we have identified the tethering protein, which is not related to LAH-1 of *Neurospora*, and we provide evidence that the HexA protein is not only a structural building block of the Woronin body core, but can additionally bind to the tether. In conclusion, we describe a model for the common architecture at the pore of the *Ascomycota* and this should enable us to unravel the evolutionary process that led to two distinct tethering mechanisms in filamentous fungi.

Results

Generation and characterization of an *A. fumigatus* $\Delta hexA$ mutant

Hex proteins are the major constituents of Woronin bodies and proteins homologous to *N. crassa* Hex-1 are well conserved in the filamentous *Ascomycota*. In *A. fumigatus*, HexA is encoded by AFUA_5G08830. This database entry predicts a protein of approximately 60 kDa, but so far only two HexA species of 20 and 25 kDa have been detected (Beck and Ebel, 2013). However, since larger forms of HexA may exist, we have deleted the complete locus to analyse the biological function of HexA (Fig. S1A). Mutants were obtained and verified by analytical PCR (Fig. S1B). For complementation, AFUA_5G08830 including a putative promoter region of 1000 bp was introduced by ectopic insertion. Immunoblot analysis was performed using specific monoclonal antibodies that are reactive with both forms of HexA (Y157) or exclusively recognize the 25 kDa species (Y191). These data confirmed that HexA is not expressed in the mutant, whereas similar HexA bands were detected in the complemented and the parental strain (Fig. 1A).

The $\Delta hexA$ mutant showed a normal growth on plates with AMM minimal medium (Fig. 1B) and complex media (J. Beck and F. Ebel, unpubl. obs.). Normal growth was also observed under several stress conditions, such as elevated temperatures (up to 48°C), oxidative and hyperosmotic stress (J. Beck and F. Ebel, unpubl. obs.). However, deletion of *hexA* resulted in an increased sen-

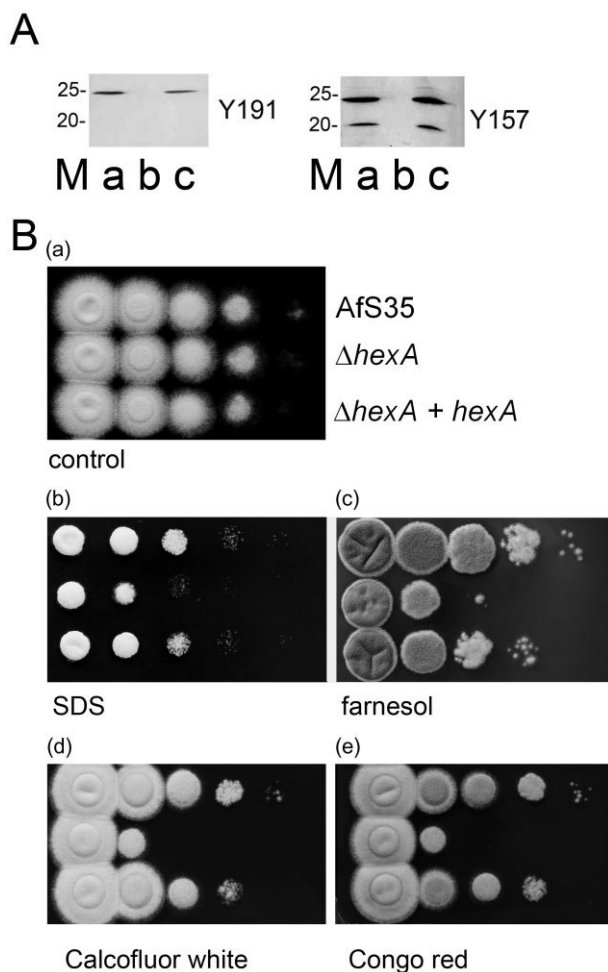


Fig. 1. Characterization of the *A. fumigatus* Δ hexA mutant.

A. Immunoblots of whole protein extracts of AfS35 (a), Δ hexA (b) and Δ hexA+hexA (c). Note, monoclonal antibody Y191 recognizes exclusively the 25 kDa form of HexA, while Y157 is reactive with both HexA species (Beck and Ebel, 2013).

B. Series of 10-fold dilutions starting with 5×10^7 conidia ml⁻¹ were spotted in aliquots of 3 μ l on YG or AMM plates. Top: AfS35, middle: Δ hexA, bottom: complemented strain. All plates were incubated at 37°C. (a) Control on YG; (b) 0.01% SDS on AMM; (c) 1 mM farnesol on YG; (d) 90 μ g ml⁻¹ Calcofluor white on YG; and (e) 120 μ g ml⁻¹ Congo red on YG.

sitivity to stressors that affect the integrity of the cell wall and membrane, such as 0.01% SDS, the antifungal agent fludioxonil, the acyclic sesquiterpene alcohol farnesol and the cell wall perturbing agents Calcofluor White and Congo Red (Fig. 1B and J. Beck and F. Ebel, unpubl. obs.). An excessive cytoplasmic bleeding has been reported for other hex mutants after wounding or exposure to hypo-osmotic shock (Jedd and Chua, 2000; Maruyama *et al.*, 2005). The *A. fumigatus* Δ hexA mutant had a wild-type resistance to hypo-osmotic stress (J. Beck and F. Ebel, unpubl. obs.), but showed a reduced outgrowth from excised mycelial plugs (Fig. 2A), indicating a higher sensitivity to physical damage.

In damaged *A. fumigatus* hyphae, Woronin bodies occlude septal pores in order to separate intact from damaged compartments (Beck and Ebel, 2013). The Δ hexA mutant lacks Woronin bodies, but to our surprise we found closed septa in wounded Δ hexA hyphae (Fig. 2B). Thus, it appears that *A. fumigatus* is able to use alternative means for closure. To quantify the loss of cytoplasm after wounding we have expressed cytosolic RFP in the mutant and the parental strain. After local damage triggered by Calcofluor white, RFP release was enhanced in supernatants of the mutant compared with the wild type (Fig. 2C) demonstrating that HexA and Woronin bodies are required for an efficient sealing of injured compartments.

During infection, immune cells attack invading hyphae and cause cell wall damage and rupture of the fungal membrane. To analyse the virulence of the Δ hexA mutant, we have performed infection experiments in mice. In a systemic model of infection, animals were intravenously infected with *A. fumigatus* conidia. Mice treated with the parental strain AfS35 or the complemented strain succumbed to infection within 3.1 and 3.3 days, respectively, whereas mice treated with the Δ hexA mutant survived in average for 11.4 days demonstrating that HexA and Woronin bodies are required for full virulence of *A. fumigatus* (Fig. 2D).

Targeting Woronin bodies to the septal pore of *A. fumigatus* – the leashin protein Lah

Having shown that Woronin bodies are part of the stress resistance repertoire of *A. fumigatus*, our interest in the cellular anchoring of this fungal-specific organelle in *A. fumigatus* was aroused. Until now, this cellular mechanism has only been studied in *N. crassa*. However, Woronin bodies in this model fungus are anchored at the lateral cell wall (Jedd and Chua, 2000; Tenney *et al.*, 2000), while in most other filamentous *Ascomycetes*, including *A. fumigatus*, they are firmly connected to the rim of the septal pore. In an elegant study, Jedd and co-workers demonstrated that the *N. crassa* leashin (*lah*) locus encodes two different proteins: LAH-1 that anchors Woronin bodies at the lateral cell wall and LAH-2 that is targeted to the hyphal apex and the septal pore, where it serves an unknown function (Ng *et al.*, 2009).

BlastN searches of fungal genome at NCBI were performed and the results for selected species representing different clades of the *Pezizomycotina* are shown in Fig. 3. Genes homologous to *Neurospora* LAH-1 were only found in *Sordaria*. While *A. fumigatus* lacks a homologue of *Neurospora* LAH-1, it has a homologue for LAH-2. However, the homology of this protein (AFUA_2G08060) to *Neurospora* LAH-2 is limited and largely restricted to a conserved region at the C-terminal ends of either protein (Fig. 3B). AFUA_2G08060 has a

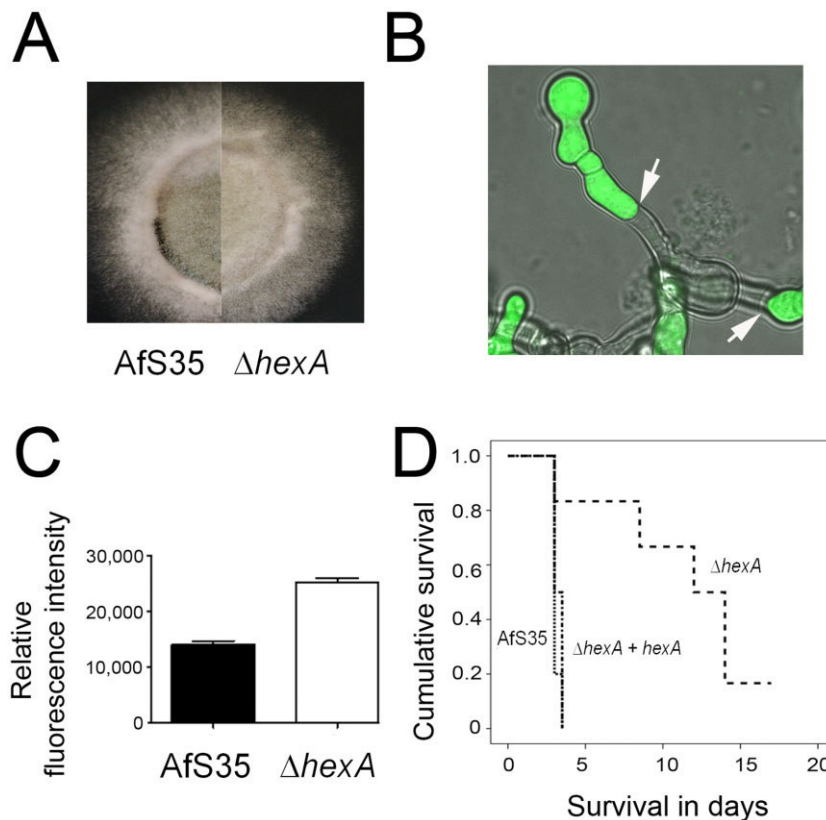


Fig. 2. Functional analysis of the $\Delta hexA$ mutant strain.

A. Growth of mycelial plugs of the $\Delta hexA$ mutant and its parental strain AfS35 that were cut-out, transferred to a new plate and further incubated at 37°C for 24 h.

B. A $\Delta hexA$ strain expressing cytosolic GFP was treated with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fludioxonil to induce local damage of the cell wall and rupturing (McCormick *et al.*, 2012). Closed septa are indicated by arrows.

C. Quantification of the release of cytosolic RFP from the $\Delta hexA$ mutant and the parental strain AfS35 treated with 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Calcofluor white for 24 h. The RFP concentration in the culture supernatant was determined as relative fluorescence intensity ($n = 6$).

D. The virulence of the $\Delta hexA$ mutant was analysed in a systemic model of infection. Mice were infected with 2×10^6 conidia of the $\Delta hexA$ mutant ($n = 6$), the parental strain AfS35 ($n = 5$) and the complemented strain ($n = 6$). Survival of mice is depicted over time. The respective P values (Student's t -test) are 0.006 (mutant versus parental strain) and 0.01 (mutant versus complemented strain).

predicted molecular weight of approximately 6000 kDa and thereby resembles *N. crassa* LAH-1 and LAH-2. This noticeable size and the conserved C-terminal domain prompted us to designate AFUA_2G08060 Lah (for leashin). The conserved C-terminal domain of *Neurospora* LAH-2 and *Aspergillus* Lah consists of 530 amino acids and alignments of related protein sequences from other *Aspergillus* species also revealed a conserved C-terminal domain of approximately 750 amino acids (J. Beck and F. Ebel, unpubl. obs.). We hypothesized that if *Aspergillus* Lah is the tether, this domain should be targeted to the septum and therefore fused the last approximately 1000 amino acids of Lah to the C-terminus of GFP (GFP–Lah_c). Expression in *A. fumigatus* wild-type hyphae resulted in signals that were clearly focused to the central part of the septum (Fig. 4A and A') indicating a specific targeting of GFP–Lah_c to the rim of the septal pore. In this context it is worth mentioning that we found no distinct localization at the tips of hyphae or germ tubes (Fig. 4B and B') as has been reported for *Neurospora* LAH-2.

The size of *A. fumigatus* Lah and its ability to bind to the septal pore suggested a role in the tethering of Woronin bodies; to fulfil this function Lah has to be able to bind to these organelles. In order to span 150 nm, which has been reported as the distance between Woronin bodies and the septal pore (Ng *et al.*, 2009), *A. fumigatus* Lah requires

binding domains at both ends. We therefore fused the first 1100 amino acids of Lah to the N-terminus of GFP (GFP–Lah_N) and indeed found that this fusion protein is targeted to organelles that are found in the cytoplasm and on either side of septal pores of *A. fumigatus* (Fig. 4C and C'). The distinct localization of these organelles in proximity to the septal pore and their limited lateral mobility (Video S1) identified them as Woronin bodies. In conclusion, *A. fumigatus* Lah possesses all properties that are required for tethering of Woronin bodies to the septum.

To prove that Lah is essential for the localization of Woronin bodies at the septal pore of *A. fumigatus* we generated a mutant lacking the C-terminal domain of Lah (*lahΔC*) (Fig. S2). To study the localization of Woronin bodies we expressed GFP–HexA, which was recently shown to be exclusively localized in *Aspergillus* Woronin bodies (Beck *et al.*, 2013). In the *lahΔC* mutant, Woronin bodies were found in the cytoplasm, but not at the septa (Fig. 5B). They showed a dynamic movement and a strong tendency to form larger aggregates (Fig. 5A and Video S2). These data confirm that *A. fumigatus* Lah is the tether and essential for anchoring of Woronin bodies at the septal pore. Moreover, the *lahΔC* mutant allowed us to analyse the functional importance of the free, cytoplasmic Woronin bodies for stress resistance of *A. fumigatus*. In drop dilution assays we observed no increased sensitivity



D. Prediction of membrane-spanning region in WSC and WscA using the TMpred algorithm.

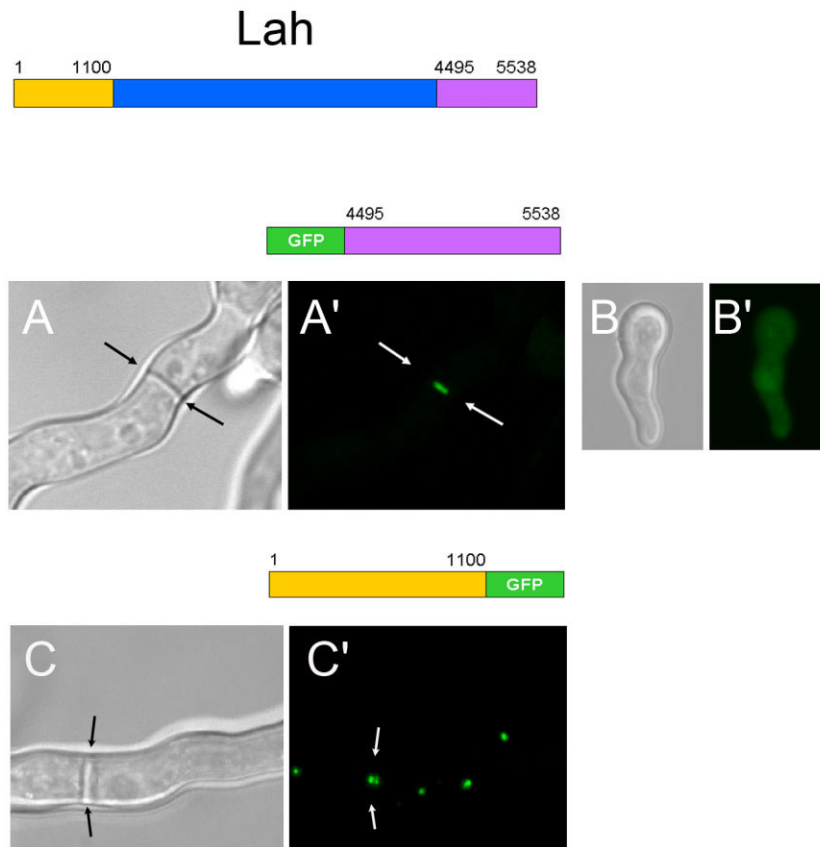


Fig. 4. The N- and C-terminal domains of *A. fumigatus* Lah bind to the septal pore and the surface of Woronin bodies. The Lah protein encoded by AFUA_2G08060 consists of 5538 amino acids. The N- and C-terminal parts that were fused to GFP are indicated in the schematic drawing. The C-terminal domain Lah_C targets the fusion protein to the septal pore (A and A'). No distinct localization is evident for Lah_C-GFP in germ tubes (B and B'). The N-terminal domain Lah_N bound to Woronin bodies in the cytoplasm and on either side of the septal pore (C-C'). Arrows indicate the positions where septal cross walls originate from the lateral cell wall.

of the *lahΔC* mutant to Calcofluor white (Fig. S2C), a phenotype that is clearly distinct from that observed for the *ΔhexA* mutant (compare Fig. 1B).

Evidence for two distinct tethering mechanisms in the Pezizomycotina

In *Neurospora*, the tether protein LAH-1 was shown to bind to the C-terminal domain of the Woronin body membrane protein WSC (Ng *et al.*, 2009). WSC and its *A. fumigatus* homologue WscA (AFUA_2G17080) share substantial homology (identity: 45.9%/similarity: 56.1%) and a common molecular architecture comprising four

membrane-spanning domains (Fig. 3D). However, *A. fumigatus* WscA is shorter and lacks the C-terminal domain that was shown to mediate the interaction between WSC and LAH-1 in *Neurospora* (Ng *et al.*, 2009) (Fig. 3C). Moreover, BlastP searches with this 71-amino-acid sequence revealed only two homologous database entries: the WSC proteins of *N. crassa* and *Sordaria macrospora*. Thus, several facts suggest that *N. crassa* and *A. fumigatus* use distinct molecules and intermolecular interactions for the tethering of Woronin bodies: the different C-terminal sequences in WSC and WscA, the absence of *Neurospora* LAH-1 homologues in most *Pezizomycotina*, the very limited homology between

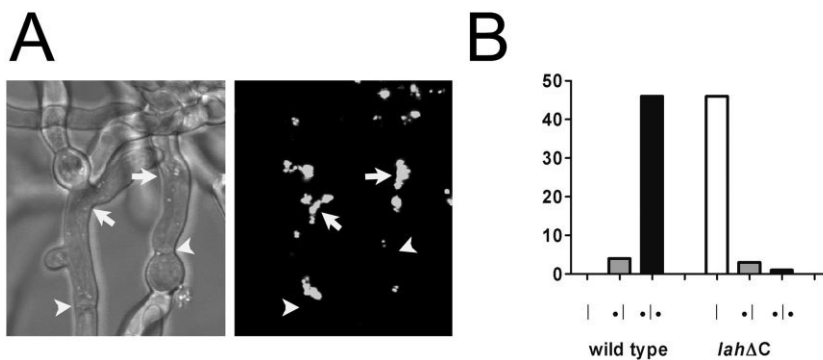


Fig. 5. Localization of Woronin bodies in the *lahΔC* mutant.

A. Representative micrograph showing the distribution of Woronin bodies in the *lahΔC* mutant (visualized by GFP-HexA). Arrows indicate clusters of Woronin bodies. Position of septa are indicated by arrowheads. B. The localization pattern of Woronin bodies was analysed for 50 septa, each of the wild type and the *lahΔC* mutant. The y-axis shows the number of events belonging to either of the following categories: no Woronin body at the septum (|), Woronin bodies at one side of the septum (•|), Woronin bodies at both sides of the septum (•|•).

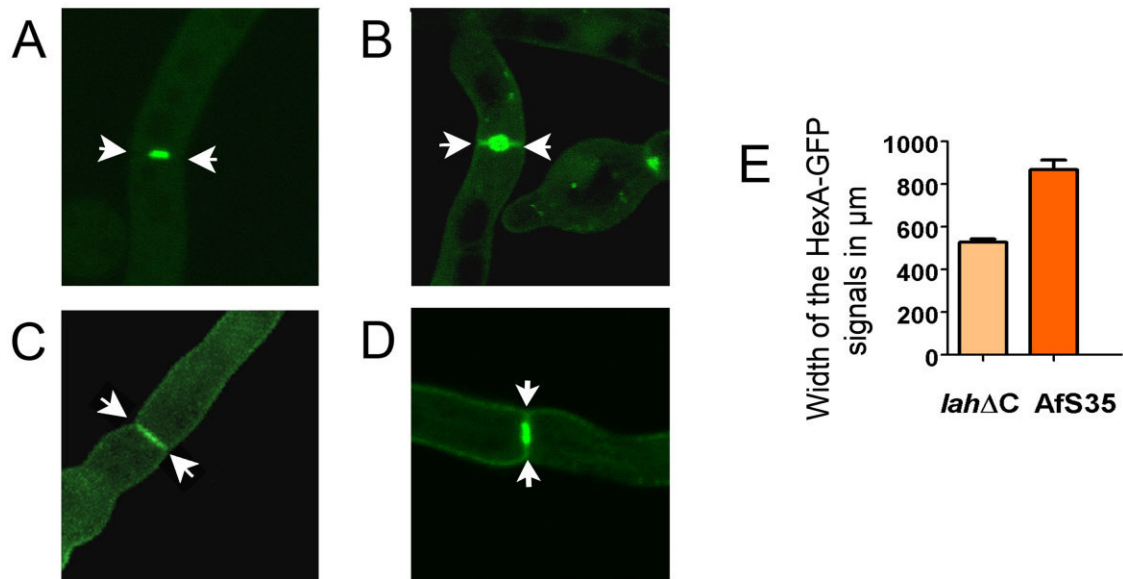


Fig. 6. The HexA protein contains a domain for targeting to the septum.

A. Targeting of GFP-Lah_c to the septal pore.

B. A HexA-GFP fusion protein in which the PTS1 motif is blocked is targeted to the septum. Note the bulky pattern at the pore and the labelling of the septal cell wall that is distinct from that observed for GFP-Lah_c.

C. Expression of HexA-GFP in the *lahΔC* mutant strain.

D. Expression of HexA-GFP in the $\Delta hexA$ mutant strain. Arrows indicate positions of septa in (A) to (D).

E. Comparison of the average width of the fluorescent areas of HexA-GFP expressed either in the *lahΔC* mutant or in the wild type measured perpendicular to the septal plane ($n = 10$).

Neurospora LAH-2 and *A. fumigatus* Lah and the association of Woronin bodies with different parts of the cell wall.

Targeting Woronin bodies to the septal pore of *A. fumigatus* – a role for HexA?

To function as a tether in *A. fumigatus*, Lah has to bind to a target molecule on the Woronin body surface. To our surprise it turned out that HexA is an excellent candidate for this receptor molecule. The C-terminal PTS-1 motif targets HexA to peroxisomes. In the HexA-GFP fusion protein, this motif is not functional, since addition of only one amino acid at the C-terminus is already sufficient to abrogate peroxisomal targeting (Gould *et al.*, 1989). *Neurospora* HEX-1 lacking the PTS-1 motif resides in the cytoplasm when expressed in yeast (Jedd and Chua, 2000) and is imported into peroxisomes by a so-called 'piggy-back' mechanism in *Neurospora* (Liu *et al.*, 2011).

In *A. fumigatus*, we observed no colocalization of HexA-GFP and Woronin bodies; HexA-GFP is instead exclusively targeted to septa (Fig. S3). At the septum, two substructures can be differentiated, a bulky structure at the pore and a fainter staining along the cross wall (Fig. 6B). This spatial distribution is clearly distinct from that observed for GFP-Lah_c, which decorates the rim of

the septal pore (Fig. 6A). In the *lahΔC* mutant, HexA-GFP is not found in the bulky structures, but exclusively at the septal cell wall (Fig. 6B). Thus, HexA-GFP is targeted to the septal pore in a Lah-dependent manner. Measurements of the width of the fluorescent areas perpendicular to the septal plane revealed that the HexA-GFP signals extended approximately 160 nm further to either side of the septum in the wild type compared with the *lahΔC* mutant (Fig. 6E). This value is in good agreement to the 150–200 nm given as the common distance between Woronin bodies and the septum (Ng *et al.*, 2009). The bulky HexA-GFP structure found in the wild type (Fig. 6B) is clearly distinct from the Woronin body pattern observed with Lah_N-GFP (Fig. 4C'). Moreover, the characteristic localization pattern of HexA-GFP was also observed in a $\Delta hexA$ mutant strain lacking Woronin bodies (Fig. 6D). Thus, targeting of HexA-GFP to the septal pore is independent of Woronin bodies, but dependent on a direct or indirect interaction between HexA and Lah. The less voluminous HexA-GFP structures found in the $\Delta hexA$ strain (compare Fig. 6B and D) may be due to the absence of Woronin bodies in this mutant (Fig. 9C).

Like GFP-Lah_c, HexA-GFP showed no distinct localization in conidia and germ tubes (data not shown) indicating that the yet unknown binding partner of Lah in the cell wall is exclusively found in hyphae and is particularly prominent at the rim of septal pores.

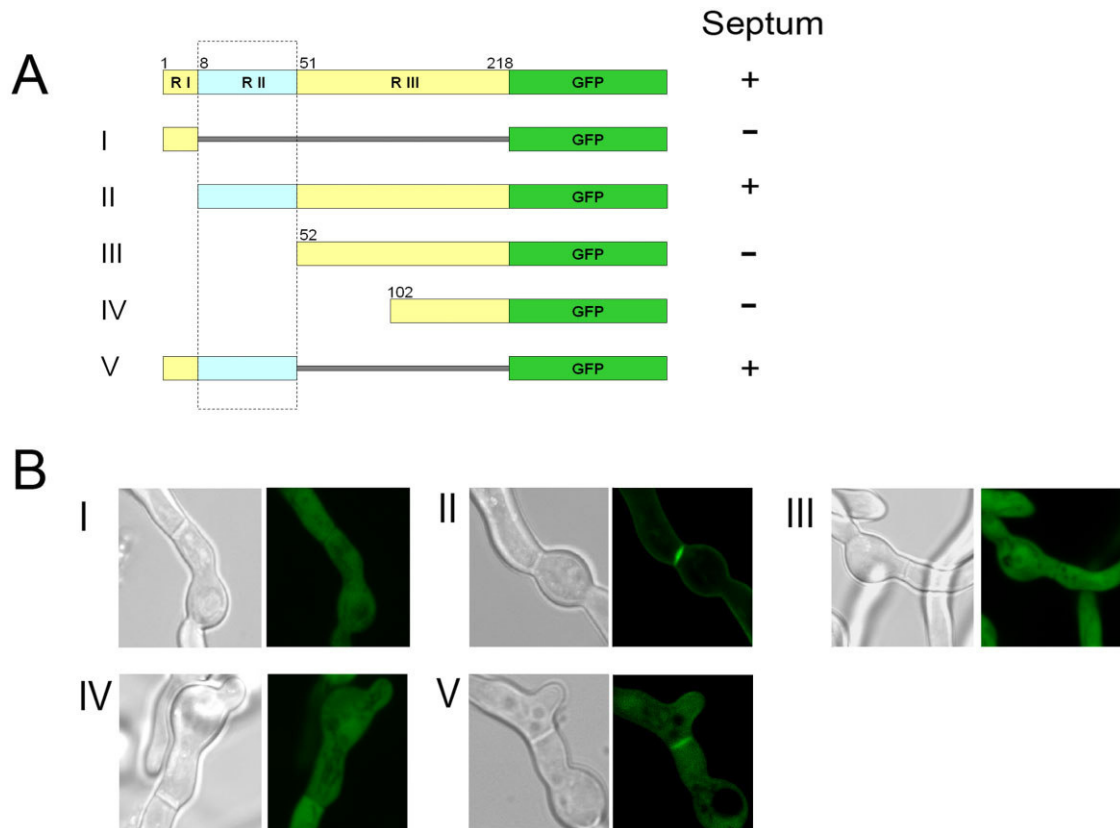


Fig. 7. Localization of truncated HexA–GFP proteins.

A. The different truncated HexA–GFP fusion proteins that were analysed by fluorescence microscopy are depicted in (A) (constructs I to V). Regions I and III are shown in yellow, while region II (corresponding to the alternatively spliced region) is depicted in blue. Numbers indicate the position of the respective amino acids of the complete HexA sequence (1–218). Binding of the respective fusion protein to the septal cell wall is indicated by +.

B. Representative immunofluorescence micrographs of the truncated HexA–GFP fusion proteins (depicted in A) after expression in *A. fumigatus* strain Afs35.

Localization of the HexA domain that targets the protein to the septal cell wall

HexA species of 20 and 25 kDa have been identified in *A. oryzae* and *A. fumigatus*. The smaller HexA species are encoded by splice variants of the respective gene (Maruyama *et al.*, 2005; Beck and Ebel, 2013). Accordingly, three parts can be distinguished in the HexA protein: the N-terminal region I (aa 1–7; encoded by exon I), the central region II (aa 8–48; corresponding to exon II that is deleted in the splice variant) and the C-terminal region III (aa 49–218; encoded by exon III). Comparison of different HexA protein sequences revealed that the sequence of region I (MGYDDD-) is well conserved in different *Aspergillus* species (data not shown). We therefore analysed whether this motif is involved in the targeting process. A region I (RI)–GFP fusion protein (construct I) was found in the cytoplasm (Fig. 7B, I). A HexA–GFP fusion lacking only region I was targeted to the septum and the lateral cell wall (Fig. 7B, II), but the staining pattern at the septal pore was

less bulky than observed for full-length HexA–GFP. Further GFP constructs containing the complete C-terminal region III or a partial sequence thereof were not targeted to the septum or the cell wall indicating that essential parts of the targeting domain reside in region I (Fig. 7, III and IV). Another GFP construct comprising regions I and II bound to the septal cell wall, but lacked the characteristic Lah binding pattern (Fig. 7B, V). In conclusion, our data demonstrate that all constructs lacking region II lost the ability for septum association. On the other hand, Lah binding appears to be dependent on a larger domain that comprises region I and parts of region III.

An alignment of *A. fumigatus* HexA and *N. crassa* HEX-1 revealed that both proteins are closely related, but the region corresponding to the alternatively spliced exon II of HexA is missing in HEX-1 (Fig. S4A). Accordingly HEX-1 was solely detected as a 19 kDa protein (Jedd and Chua, 2000), while dominant HexA species of 20 and 25 kDa were found in *A. oryzae* and *A. fumigatus* (Maruyama *et al.*, 2005; Beck and Ebel, 2013). Region II

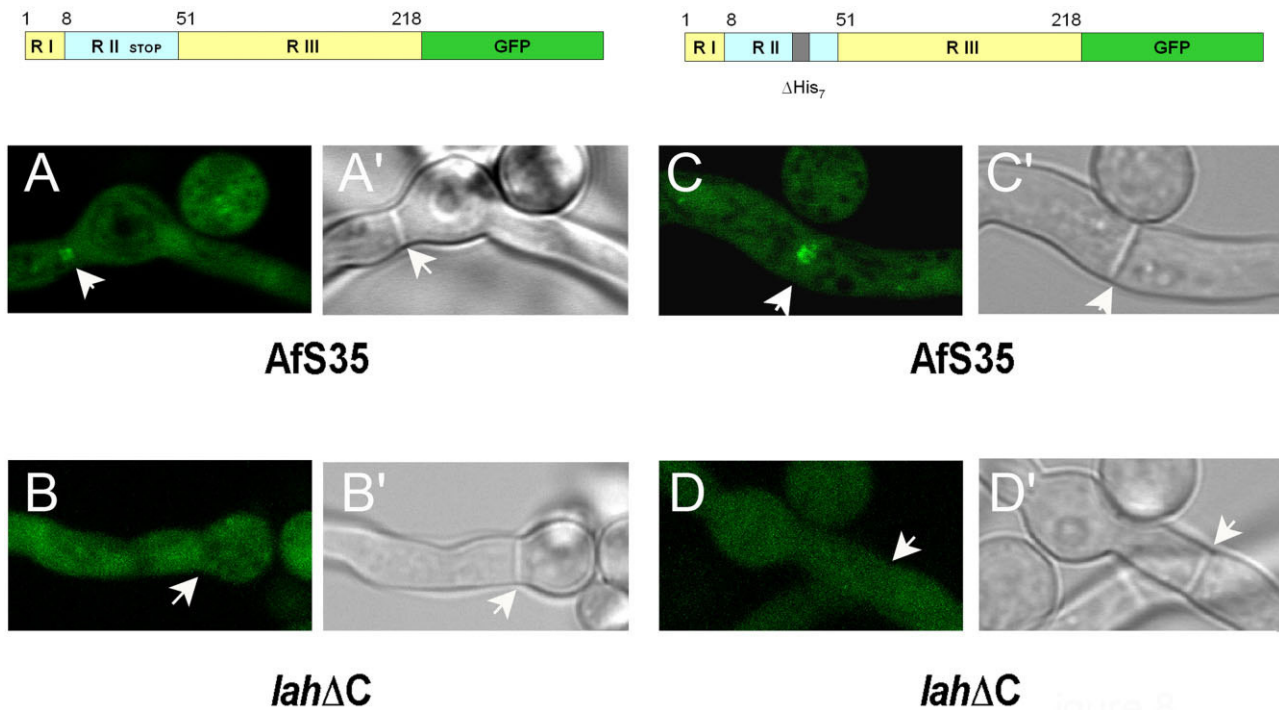


Fig. 8. Localization of HexA–GFP proteins with mutations in exon II. Schematic drawings show variants of HexA–GFP either lacking the His₇ motif (right) or comprising a STOP codon in exon II (left). Expression of the latter construct in the wild type (A and A') and the *lahΔC* mutant is shown in A/A' and B/B' respectively. Expression of HexA–GFP lacking the His₇ motif is shown for the wild type (C and C') and the *lahΔC* mutant (D and D'). Septa are indicated by arrows.

comprises a striking poly-histidine motif that is conserved in many, but not all Hex proteins (data not shown). We have mutated this His₇ motif in the HexA–GFP construct (Fig. S4B) to analyse its function. When expressed in the wild type, the corresponding fusion protein was no longer targeted to the septal wall, but was exclusively localized in the bulky structure at the septal pore (Fig. 8A and A'). This distinct localization was lost after expression in a *lahΔC* mutant background (Fig. 8B and B') demonstrating that it is dependent on Lah. The inability of this fusion protein to bind to the septal wall indicates that the poly-histidine motif is essential for this particular localization.

To determine the relevance of region II, we have also introduced a STOP codon in exon II (Fig. S4C). The resulting HexA^{STOP}–GFP fusion protein showed a comparable localization pattern as the protein lacking the His₇ motif, both in the wild type and in the *lahΔC* mutant (Fig. 8C to D'). This indicates that region II is not essentially required for the interaction of HexA with Lah. It may, however, permit an optimal spacing of the binding elements encoded by region I and parts of region III. Finally we have transformed a Δ *hexA* mutant with the *hexA* allele comprising the STOP codon in exon II. As expected, this strain expressed only the 20 kDa form of HexA (Fig. S5A). In drop dilution assays, it showed an intermediate sensitivity to Calcofluor white and Congo red (Supplementary

Fig. S5C) indicating that the 20 kDa HexA protein alone is not sufficient to gain full functional complementation.

Discussion

Invasive aspergillosis is a disease associated with an unacceptable high lethality (Lin *et al.*, 2001). At particular risk are neutropenic patients and the ability of neutrophils to directly attack hyphae, is crucial for a successful anti-*Aspergillus* immune response. To withstand this host response, *Aspergillus* hyphae have to be able to survive local damage and concomitant lysis. Due to the fact that hyphal compartments form a continuous entity, an efficient mechanism for sealing of septal pores is required and in *Aspergillus*, as in most filamentous *Ascomycota*, Woronin bodies are directly tethered to the pore to be immediately able to occlude the opening in case of damage.

The role of Woronin bodies in the stress response of A. fumigatus

The major Woronin body constituent is the Hex protein that self-assembles into an electron-dense core structure (Yuan *et al.*, 2003). Deletion of the corresponding gene in *N. crassa* led in a reduced growth on minimal medium and defects in sporulation (Jedd and Chua, 2000; Tenney *et al.*,

2000), but the hallmark of most *hex* mutants is a massive cytoplasmic bleeding at hyphal tips that can be provoked by flooding with distilled water (Jedd and Chua, 2000; Tenney *et al.*, 2000; Maruyama *et al.*, 2005). The *A. fumigatus* $\Delta hexA$ mutant generated in this study showed normal growth, sporulation and resistance to hypo-osmotic stress. This indicates that filamentous fungi differ in their ability to compensate for the loss of Woronin bodies.

Despite its normal growth under several stress conditions, the $\Delta hexA$ mutant showed a higher sensitivity to physical injury and cell wall stress and an increased loss of cytoplasm after leakage. Although, lack of Woronin bodies' results in a reduced ability of wounded hyphae to limit the harm, the phenotype of the $\Delta hexA$ mutant is clearly less dramatic than those reported for other fungi, e.g. *N. crassa*. This suggests a residual capacity of the *A. fumigatus* mutant to close its septal pores, for which evidence has indeed been obtained in this study. The cytoplasmic flow may be able to push other organelles into the opening of the pore, or alternatively, so-called SOFT proteins or other septal-pore-associated proteins may facilitate distinct closure mechanisms (Fleissner and Glass, 2007; Maruyama *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2012). The phenotype of the $\Delta hexA$ mutant suggests that said alternative mechanisms are apparently less efficient than the Woronin body-dependent process. The enhanced *in vitro* stress sensitivity of the $\Delta hexA$ mutant correlates with an attenuation in virulence observed in a murine model of infection. Thus, Woronin bodies are an important element in the stress resistance repertoire of *A. fumigatus*.

The tethering of Woronin bodies in *Neurospora crassa*

The mechanism of septal closure established in the *Pezi-zomycotina* is a fascinating cellular mechanism that we are just beginning to understand. Studies have been carried out in *Neurospora*, but this fungus is unusual in several aspects. Woronin bodies are anchored at the lateral cell wall (Ng *et al.*, 2009); while in most other filamentous *Ascomycetes* they are positioned directly at the septum. Woronin bodies are physically linked to the cell wall by elastic and most likely filamentous structures (Berns *et al.*, 1992; Momany *et al.*, 2002). In *N. crassa*, the relevant tethering protein has been identified as LAH-1 (Ng *et al.*, 2009). LAH-1 and LAH-2 are encoded by the so-called *leashin* locus. Both proteins are extremely large and harbour binding domains at their N- and C-termini. The N-terminus of *Neurospora* LAH-1 binds to the C-terminus of the Woronin body-specific membrane protein WSC, while the corresponding C-terminal domain interacts with an unknown component in cell cortex. The function of *Neurospora* LAH-2 is unclear, but it is required for normal colony growth and

localizes at the hyphal apex and the septal pore (Ng *et al.*, 2009). In *Neurospora*, expression of a fusion protein consisting of the N-terminal part of LAH-1 and the C-terminal part of LAH-2 reconstituted the Woronin body localization pattern commonly found in filamentous *Ascomycota* (Ng *et al.*, 2009). Accordingly, it was postulated that the cellular architecture found in the *Neurospora*–*Sordaria* clade evolved by splitting of an ancestral leashin protein into LAH-1 and LAH-2 (Jedd, 2011).

Identification of Lah as the tethering protein in *A. fumigatus*

Aspergillus fumigatus Lah and the *Neurospora* tether LAH-1 are comparable in size, but share no homology. Homology between Lah and *Neurospora* LAH-2 is restricted to a small C-terminal domain that in LAH-2 was shown to bind to the septum and the hyphal apex (Ng *et al.*, 2009). A GFP fusion to the C-terminal domain of *Aspergillus* Lah binds exclusively to the rim of the septal pore. This is in agreement to the recent observation that *A. fumigatus* Woronin bodies, in contrast to those of *N. crassa*, are not abundant in the hyphal apex (Beck and Ebel, 2013). The N-terminal domain of Lah decorates organelles that were identified as Woronin bodies based on their characteristic localization and spatial dynamics. Thus, *A. fumigatus* Lah binds with its C-terminal domain to the rim of the septal pore and connects with its N-terminal domain the surface of Woronin bodies with the septum. In this context it is worth mentioning that the septum-targeting domain of Lah is conserved in *Neurospora* LAH-2, whereas the Woronin body targeting domain is not.

The non-redundant function of *A. fumigatus* Lah in the tethering of Woronin bodies was proven in a mutant strain lacking the C-terminal domain of Lah (*lah Δ C*). Here, all Woronin bodies were freely motile in the cytoplasm, but tend to form unusual clusters. Electron microscopic studies in *A. nidulans* revealed evidence for a filamentous nature of the tether (Momany *et al.*, 2002). This suggests that individual tether proteins assemble into fibres. The *Neurospora* LAH proteins comprise repetitive sequences that may participate in this multimerization process. These repeats are not conserved in *Aspergillus* Lah that harbours several striking poly-lysine stretches instead. In the *lah Δ C* mutant, Lah lacks its C-terminal domain. Thus, truncated Lah proteins are still expressed and should bind to Woronin bodies. These large proteins may interact and thereby mediate the observed clustering of Woronin bodies. Remarkably, the *A. fumigatus* *lah Δ C* mutant showed no enhanced sensitivity to cell wall stress. This obvious difference to the $\Delta hexA$ mutant suggests that cytoplasmic Woronin bodies are of particular importance in this context; either as an efficient back-up system for

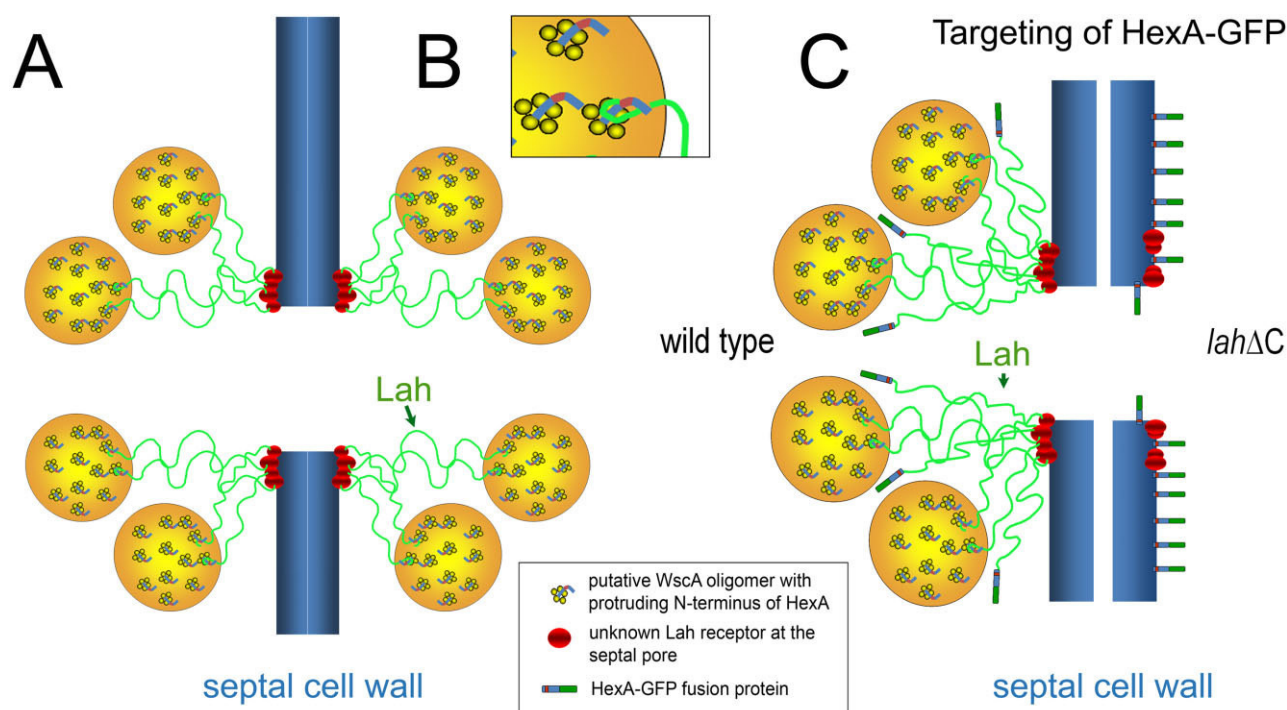


Fig. 9. Model of Woronin body tethering and HexA-GFP targeting in *A. fumigatus*.

A. Woronin bodies are physically linked to the cross wall in proximity to the septal pore. Lah is the relevant tether protein. Our data suggest that the N-terminus of HexA binds directly or indirectly to the N-terminal domain of Lah. We propose the existence of a membrane pore allowing HexA to expose its N-terminus on the surface of the organelle. Indirect evidence suggests that the Woronin body protein WscA may be able to form such a pore.

B. The putative organization of this pore is shown in the enlargement depicted in (B).

C. Binding of HexA-GFP differs between *A. fumigatus* wild type and the *lahΔC* mutant. We propose that this difference can be attributed to binding of HexA to the N-terminus of Lah. The GFP in HexA-GFP is depicted in green. The position of region II in the HexA portion is indicated.

septal closure or as organelles that have additional functions. The latter is suggested by the finding that an *A. fumigatus* mutant lacking the Woronin body membrane protein TmpL is impaired in intracellular redox homeostasis and virulence (Kim *et al.*, 2009).

The apparent role of Aspergillus HexA in the tethering process

Although we could unambiguously show that Lah is the tethering protein in *A. fumigatus*, its evolutionary relationship to *Neurospora* LAH-1/LAH-2 is still difficult to assess. Obviously, the development of the different tethering mechanisms is more complex than initially anticipated. The identification of the *A. fumigatus* Woronin body protein that interacts with the tether appeared to be a difficult task, but unexpectedly we found evidence suggesting that HexA is this protein. Hex proteins are targeted to peroxisomes by their C-terminal PTS1 motif. In a HexA-GFP fusion protein, the PTS1 motif is blocked and we expected a localization in the cytoplasm or peroxisomes, instead HexA-GFP was specifically targeted to the septum of *A. fumigatus*.

Two cellular structures were apparently labelled by HexA-GFP, the septal cross wall and a broader structure in the pore region. The latter pattern is Lah-dependent and its size fits well to the expected length of the Lah molecule. Woronin bodies also interact with Lah, but are not involved in the HexA-GFP targeting to the septal pore. Thus, HexA-GFP apparently binds directly or indirectly to Lah that in turn is anchored at the rim of the pore (Fig. 9).

The distinct localization pattern of HexA-GFP enabled us to analyse truncated and mutated fusion proteins for their ability to bind to the septal cell wall and Lah. Due to the exon/intron structure of its gene, HexA consists of three regions (I to III). Data obtained with several truncated HexA proteins suggest that binding to the septal cell wall depends on region II, whereas region I and the N-terminal part of region III cooperate in Lah binding.

Hex proteins in *A. fumigatus*, but also in *Trichoderma reesei*, *M. grisea* and *A. oryzae* exist as two protein species that arise from alternative splicing (Curach *et al.*, 2004; Soundararajana *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2005; Beck and Ebel, 2013). Interestingly, this common gene structure is not conserved in *N. crassa*. HEX-1 harbours an

intron at a similar position, but expression of a larger, non-spliced form is prevented by a frameshift and consequently, only one form of the HEX-1 protein exists in *Neurospora* (Jedd and Chua, 2000). To further analyse the function of region II that is exclusively found in the large HexA protein we have introduced a STOP codon in the corresponding exon. Expression of the mutated HexA proved that this leads to a strain lacking the larger form of HexA. The corresponding HexA^{STOP}–GFP construct showed a Lah-dependent binding at the pore, but no decoration of the septal cross-wall. Region II contains a striking poly-histidine motif that is conserved in many Hex proteins, but not in *Neurospora* HEX-1. A mutated protein, in which all histidine residues have been substituted maintained its ability to bind to *Aspergillus* Lah, but was no longer able to decorate the septal wall. We therefore assume that the poly-histidine motif facilitates movement of Woronin bodies along the septal cell wall towards the pore.

To bind to *Aspergillus* Lah, parts of HexA have to be exposed on the Woronin body surface. *Neurospora* HEX-1 recruits WSC at the peroxisomal membrane to co-ordinate Woronin body morphogenesis and inheritance (Liu *et al.*, 2008). The high homologies between the members of the HEX and WSC protein families suggest that these interactions are conserved in the filamentous *Ascomycota*. WSC and WscA are four-pass transmembrane proteins that belong to the PMP22/MPV17 gene family. Interestingly, a mammalian PMP22 has been recently shown to assemble into oligomers that form a channel in the peroxisomal membrane allowing the transport of small molecules (Rokka *et al.*, 2009) and *Neurospora* WSC assembles into detergent-resistant oligomers whose structural integrity is influenced by HEX-1 (Liu *et al.*, 2008). It is therefore tempting to speculate that WscA assembles into a pore-like structure. This could allow WscA-associated HexA molecules to expose their N-termini on the surface of the *A. fumigatus* Woronin bodies, where they could interact with Lah (Fig. 9).

In the *Pezizomycotina*, the localization pattern of Woronin bodies found in *Neurospora* is clearly the exception and not the rule. In this study, we describe the mechanism operating in *A. fumigatus*. Namely, we identify Lah as a novel tether protein and the HexA–Lah axis as an excellent candidate for the structure that links Woronin bodies to the septal pore. Our model attributes an important cellular function to a protein that was so far supposed to be merely the main structural building block of the Woronin body core. We believe that our findings provide a blueprint for the cellular architecture found in most *Pezizomycotina*. With this in hand it should be possible to unravel the evolution of this fascinating and unique part of the cellular machinery that contributes to stress resistance and virulence of filamentous fungi.

Experimental procedures

Nomenclature

At a meeting in Copenhagen in 2004 the *A. fumigatus* genome sequencing group proposed a nomenclature based on the Demerec bacterial system (i.e. *abdD* for genes). In our manuscript we followed these recommendations for all *Aspergillus* genes.

Strains and media

The *A. fumigatus* strain AfS35 is a derivative of strain D141 lacking the homologous end-joining component *AkuA* (Krappmann *et al.*, 2006). *Aspergillus* minimal medium (AMM) and yeast glucose medium (YG) medium were prepared as described (Kotz *et al.*, 2010), but in this study AMM was supplemented with 0.2 M ammonium chloride as nitrogen source. Conidia were isolated as describes previously (Rohde *et al.*, 2002).

Sequence analysis and database searches

Sequences from *Aspergillus* Hex-1 homologous sequences were obtained from the Central *Aspergillus* REsource (CADRE; <http://www.cadre-genomes.org.uk/>). Homology searches were performed using BlastP at Fungal Genomes Central-NCBI-NIH (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi) and BlastN at NCBI. Sequence alignments and prediction of transmembrane regions were generated using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) respectively.

Construction of the Δ hexA mutant strain

All oligonucleotides used in this study are listed in Table 1. For cloning experiments, PCR reactions were performed using the Pfu DNA polymerase (Promega, Mannheim, Germany). To construct a suitable replacement cassette, a 3.5 kb hygromycin resistance cassette was excised from pSK346 using SfiI. The flanking regions of the *hexA* gene (approximately 1000 bp each) were amplified by PCR from chromosomal DNA using the oligonucleotide pairs hexA-up-for/hexA-up-rev-ClalSfiI and hexA-down-forClalSfiI and hexA-down-rev. Both fragments were cloned into pCR2.1 using the TA cloning kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany). The downstream fragment was cut out using Clal and the vector derived NotI site, purified and cloned into the Clal and NotI digested pCR2.1 containing the upstream fragment. The hygromycin cassette was excised from pSK346 and ligated into the SfiI site of the target vector. A deletion cassette of 5.5 kb was generated by digestion with NotI and KpnI and used for transformation of *A. fumigatus* AfS35 as described previously (Kotz *et al.*, 2010). The resulting protoplasts were transferred to AMM plates containing 1.2 M sorbitol and either 200 µg ml⁻¹ hygromycin (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) or 0.1 µg ml⁻¹ pyrithiamine (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). *Aspergillus* protoplasts

Table 1. Oligonucleotides used in this study.

Designation	Sequence
hexA-up-for	CGG CTT CTC CGT GTG ATG AG
hexA-up-rev-ClaSfil	ATC GAT GGC CGT AGT GGC C GCC ATC CAG GAA GCT TCC CCA TAC G
hexA-down-for-ClaSfil	ATC GAT GGC CAT CTA GGC CGC GTC TAA GCC TCT TTC GGC
hexA-down-rev	ACG GAC AAG CTT GGT TGC TT
hexA-up-for-1100bp	GAG TAG CCA TGA AAC CAG AGC
hexA-down-rev-1100bp	GCA ACT TGA TCG ACT TAC GGC
trpCt-forward	CAG AAT GCA CAG GTA CAC TTG
hph-3	CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AG
hexA-Pro-Nsil	GCG ATG CAT GCC ATC GGC TTC TCC GTG TGA TG
hexA-5'	ATG TAC TCC GTA GAA AGT AAG
hexA-3'	TTA CAG ACG GGA ACC GTG GAT GAC CTT
hexA-short-5'-Bsp1407I	GCG TGT ACA ATG GGT TAC TAC GAC GAC
hexA-blunt-end-short-5'	ATG GGT TAC TAC GAC GAC GAC
hexA-rev-GFP	GCC AGA CGG GAA CCG TGG AT
hexA-N-Term-Motif-5'-PmeI	GTT TAA ACA TGG GTT ACT ACG ACG ACG ACA TGG TGA GCA AGG GCG AG
GFP-Bsp1407-3'	GCG TGT ACA GCT GTC CAT GCC GTG AGT GAT
Exon1-5'	ATG GGT TAC TAC GAC GAC GAC
hexA-Exon2-3'	GCG CCA TCA CGG TAA CGA ACT GG
-Exon1-5'	ATG GGT AAC TAC CAC TCC TTC CGC
1/2-Exon3-5'	ATG TCC CCT CAG ACC GGC CAG CAC
Exon3-5'	ATG CGT GAT GGC GTC CGC GAG GAT
hexA-rev-GFP	GCC AGA CGG GAA CCG TGG AT
P-HexA-Intron-Stop-EcoRV-5'	CAC TCC TTC CGC CGT GAT ATC TAG CGT GCT GTC GAC CGC
P-HexA-GFP-Intron-ΔHis-5'	ACC GCA TCA CGC ATC CAT TCG GCG CCG GCG CCG GCG CCG GCG ATC GTG AGG AAG TAG TCA
lah-1000AS-C-Term-5'-Bsp1407I	GCG TGT ACA GCC ATT GCA GAG TTC GAC GAG
lah-C-Term-3'	TCA GAT CAC GTT GCT GAT ATC CAT GGT CGA
lah-1000AS-N-Term-5'	GAT GTT CAG GGC CCT GAT GGG CGG G
lah-1000AS-N-Term-3'	GCT CTA TCA ATG AGC TGC ACG CC
lah-up-for	ACG GTA GAC GCT GGG GAA AGG
lah-up-rev-Sfil	GCC GGC CTG AGT GGC CTG GCT CAA AAG GAA CCG C
lah-down-for-Sfil	GCC GGC CAT CTA GGC CGG CGT CAC ACT CTG GTC A
lah-down-rev	GGA AAC CGA AAT CTG GAT AGA

Restriction sites are indicated in bold.

were generated, and transformation was performed essentially as described previously (Punt and van den Hondel, 1992).

For the complementation construct AFUA_5G08830 plus 1 kb upstream region was amplified from chromosomal DNA using oligonucleotides hexA+Pro-Nsil and hexA-3' and cloned into a linearized vector obtained after excision of the *gpdA* promoter from pSK379 using EcoRV and Nsil. The resulting plasmid was purified and used for transformation of the Δ hexA mutant. To verify the mutant and the complemented strain, we have amplified the entire AFUA_5G08830 locus plus a 1 kb upstream region using hexA-up-For-1100bp and hexA-3' (PCR1) and the AFUA_5G08830 locus using oligonucleotides hexA-5'/hexA-3' (PCR2). The correct integration of the deletion cassette was analysed at the 5' end using oligonucleotides hexA-up-for-1100bp and hph-3 (PCR3) and at the 3' end using oligonucleotides trpCt-forward and hexA-down-rev-1100bp (PCR4).

Construction of the *lah*ΔC mutant strain

To delete 3300 bp at the 3' end of *lah*, flanking regions of 1000 bp each were amplified using oligonucleotide combinations lah-up-for/lah-up-rev-Sfil and lah-down-for-Sfil/lah-down-rev. The resulting fragments were ligated to a 3.5 kb

hygromycin resistance cassette (excised from pSK346 by Sfil digestion) with the help of primer derived Sfil sites. The deletion cassette was sequenced and introduced into strain AfS35 as described above. To verify the mutant, we amplified the 3'-region of *lah* using oligonucleotides lah-1000AS-C-Term-5' and lah-C-Term-3' (PCR1). The inserted hygromycin cassette was detected using the primer combinations lah-up-for/hph-3' (PCR2) and trpCt-forward/lah-down-rev (PCR3).

Immunoblot assays

HexA-specific monoclonal antibodies, the preparation of hyphal protein extracts and the production and development of Immunoblots have been described recently (Beck and Ebel, 2013).

Phenotypic plate assays

Isolated conidia were counted using a Neubauer chamber. For drop dilution assays, a series of Ten-fold dilutions starting with 5×10^7 conidia ml⁻¹ were spotted onto plates in aliquots of 3 µl. These plates were supplemented with the indicated agents and incubated at 37°C. To test the sensitivity to physical damage mycelial plugs were cut out and

majority of the attached agar was removed. Subsequently, they were placed on a fresh agar plate and further incubated for 24 h at 37°C.

RFP release assay

Resting conidia of AfS35 and the $\Delta hexA$ mutant expressing cytosolic RFP were seeded with 5×10^5 spores per ml AMM in a 24-well plate. After overnight incubation at 30°C, germ tubes were incubated with 90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Calcofluor White. After further incubation for 24 h at 37°C, 100 μl of cell-free culture supernatant were removed and RFP fluorescence was quantified using a FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany).

Construction of strains expressing fluorescent fusion proteins

Strains expressing cytosolic GFP or RFP were generated using derivatives of pSK379 that comprise the respective gene under the control of the *gpdA* promoter (Beck and Ebel, 2013). To generate a GFP–HexA fusion the entire *hexA* sequence was amplified using oligonucleotides hexA-short-5'-Bsp1407I and hexA-3'. The resulting fragment was cloned into the pSK379sGFPsingleEcoRV vector digested with Bsp1407I and EcoRV. A HexA–GFP construct was generated using a *hexA* fragment that was amplified using oligonucleotides hexA-blunt-end-short-5' and hexA-rev-GFP. The gene was subsequently introduced into the PmeI site of pSK379sGFP vector.

To generate constructs in which GFP was fused to truncated Hex sequences, the appropriate parts of the *hexA* sequence were amplified by PCR and cloned into the PmeI site of psk379sGFP. For mutation of the HexA His₇ motif and for introduction of a STOP codon into the intron sequence we used the Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affymetrix) and oligonucleotide combinations P-HexA-Intron-Stop-EcoRV-5'/Amp-rev and P-HexA-GFP-Intron-delta-His-5'/Amp-rev respectively. To fuse the C-terminal domain of Lah to the C-terminus of GFP the corresponding region of *lah* was amplified using oligonucleotides lah-1000AS-C-Term-5'-Bsp1407I and lah-C-term-3' and the resulting fragment was subsequently cloned into the Bsp1407I site of psk379sGFP. To fuse the N-terminal domain of Lah to the N-terminus of GFP we amplified the corresponding region using lah-1000AS-N-Term-5' and lah-1000AS-N-Term-3' and cloned it into the PmeI site of psk379sGFP.

Live cell imaging

For live cell imaging eight-well ibidi-chambers (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) containing 300 μl AMM were inoculated with resting conidia of the respective strain expressing a fluorescent protein. After hyphae reached an appropriate length they were analysed using a Leica SP-5 microscope equipped with an environmental chamber adjusted to 37°C (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). All micrographs were taken using a Leica HCX PLAPO lamda blue 63 \times 1.4 Oil UV objective. Further image processing was performed using

Adobe Photoshop CS. Time-lapse confocal images were recorded using a Leica SP-5 microscope under the conditions described above. The resulting image stacks were merged and exported as avi files using the SP-5 and ImageJ software.

Infection experiments

All animal experiments were performed in accordance to the national regulations in Germany and with permission of the Regierung der Oberpfalz, Regensburg, Germany. Briefly, 2×10^6 conidia of the $\Delta hexA$ mutant, the complemented mutant or the parental strain AfS35 each in a final volume of 300 μl PBS containing 0.02% Tween 20 were injected retro-orbitally into BALB/c (Thy1.1) mice. The viability of the inoculums was controlled by incubating aliquots of conidia overnight in YG medium and subsequent microscopic inspection. Survival of infected animals was monitored once a day. Kaplan–Meier survival curves were compared using the log-rank test (SPSS 15.0 software). *P*-values of < 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Marzena Broniszewska and Eveline Roeseler for excellent technical assistance and Kirsten Niebuhr for critical reading of the manuscript. This study was supported by a grant of the Wilhelm-Sander-Stiftung (2007.102.2).

References

- Beck, J., and Ebel, F. (2013) Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* **303**: 90–97.
- Beck, J., Wagoner, J., and Ebel, F. (2013) The septal cell wall of filamentous fungi. In *The Fungal Cell Wall*. Manuel Mora-Montes, H. (ed.). New York: Nova Science Publishers, pp. 129–142.
- Berns, M.W., Aist, J.R., Wright, W.H., and Liang, H. (1992) Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. *Exp Cell Res* **198**: 375–378.
- Bleichrodt, R.J., van Veluw, G.J., Recter, B., Maruyama, J., Kitamoto, K., and Wösten, H.A. (2012) Hyphal heterogeneity in *Aspergillus oryzae* is the result of dynamic closure of septa by Woronin bodies. *Mol Microbiol* **86**: 1334–1344.
- Bouzani, M., Ok, M., McCormick, A., Ebel, F., Kurzai, O., Morton, C.O., et al. (2011) Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- γ release. *J Immunol* **187**: 1369–1376.
- Brakhage, A.A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P.F., and Behnken, J. (2010) Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **13**: 409–415.
- Collinge, A.J., and Markham, P. (1985) Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Exp Mycol* **9**: 80–95.
- Curach, N.C., Te'o, V.S., Gibbs, M.D., Bergquist, P.L., and Nevalainen, K.M. (2004) Isolation, characterization and expression of the *hex1* gene from *Trichoderma reesei*. *Gene* **331**: 133–140.

- Diamond, R.D., Krzesicki, R., Epstein, B., and Jao, W. (1978) Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes *in vitro*. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol* **91**: 313–328.
- Fleissner, A., and Glass, N.L. (2007) SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot Cell* **6**: 84–94.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**: 1657–1664.
- Jedd, G. (2011) Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol* **21**: 12–19.
- Jedd, G., and Chua, N.H. (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**: 226–231.
- Kim, K.H., Willger, S.D., Park, S.W., Puttikamkul, S., Grahl, N., Cho, Y., *et al.* (2009) TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and an animal fungal pathogen. *PLoS Pathog* **5**: e1000653.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., and Stalpers, J.A. (2001) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th edn. Wallingford, UK: CAB International.
- Kotz, A., Wagener, J., Engel, J., Routier, F.H., Echtenacher, B., Jacobsen, I., *et al.* (2010) Approaching the secrets of N-glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: characterization of the AfOch1 protein. *PLoS ONE* **5**: e15729.
- Krappmann, S., Sasse, C., and Braus, G.H. (2006) Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell* **5**: 212–215.
- Lai, J., Koh, C.H., Tjota, M., Pieuchot, L., Raman, V., Chandrababu, K.B., *et al.* (2012) Intrinsically disordered proteins aggregate at fungal cell-to-cell channels and regulate intercellular connectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 15781–15786.
- Latgé, J.P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**: 310–350.
- Lew, R.R. (2005) Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **151**: 2685–2692.
- Lin, S.J., Schranz, J., and Teutsch, S.M. (2001) Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**: 358–366.
- Liu, F., Ng, S.K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., and Jedd, G. (2008) Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *J Cell Biol* **180**: 325–339.
- Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., and Jedd, G. (2011) Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Dev Cell* **21**: 457–468.
- McCormick, A., Loeffler, J., and Ebel, F. (2010) *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* **12**: 1535–1543.
- McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., and Ebel, F. (2012) The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* **7**: e38262.
- Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Ishi, K., and Kitamoto, K. (2005) Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1081–1088.
- Maruyama, J., Escaño, C.S., and Kitamoto, K. (2010) AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **391**: 868–873.
- Momany, M., Richardson, E.A., Van Sickle, C., and Jedd, G. (2002) Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia* **94**: 260–266.
- Ng, S.K., Liu, F., Lai, J., Low, W., and Jedd, G. (2009) A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS Genet* **5**: e1000521.
- Plamann, M. (2009) Cytoplasmic streaming in *Neurospora*: disperse the plug to increase the flow? *PLoS Genet* **5**: e1000526.
- Punt, P.J., and van den Hondel, V.A. (1992) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol* **216**: 447–457.
- Rohde, M., Schwienbacher, M., Nikolaus, T., Heesemann, J., and Ebel, F. (2002) Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 99–105.
- Rokka, A., Antonenkov, V.D., Soininen, R., Immonen, H.L., Pirlä, P.L., Bergmann, U., *et al.* (2009) Pxmp2 is a channel-forming protein in mammalian peroxisomal membrane. *PLoS ONE* **4**: e5090.
- Schmidt, S., Tramsen, L., Hanisch, M., Latgé, J.P., Huenecke, S., Koehl, U., and Lehnbecher, T. (2011) Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J Infect Dis* **203**: 430–435.
- Soundararajana, S., Jedd, G., Lia, X., Ramos-Pamplona, M., Chuab, N.H., and Naqvai, N.I. (2004) Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *Plant Cell* **16**: 1564–1574.
- Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J.I., McClain, C., Bowman, E.J., and Bowman, B.J. (2000) Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genet Biol* **31**: 205–217.
- Verweij, P.E., Kema, G.H., Zwaan, B., and Melchers, W.J. (2012) Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus*. *Pest Manag Sci* **69**: 165–170.
- Woronin, M. (1864) Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pucherrimus* Cr. und einiger Pezizen. *Abh Senkenb Naturforsch* **5**: 355–344.
- Yuan, P., Jedd, G., Kumaran, D., Swaminathan, S., Shio, H., Hewitt, D., *et al.* (2003) A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*. *Nat Struct Biol* **10**: 264–270.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

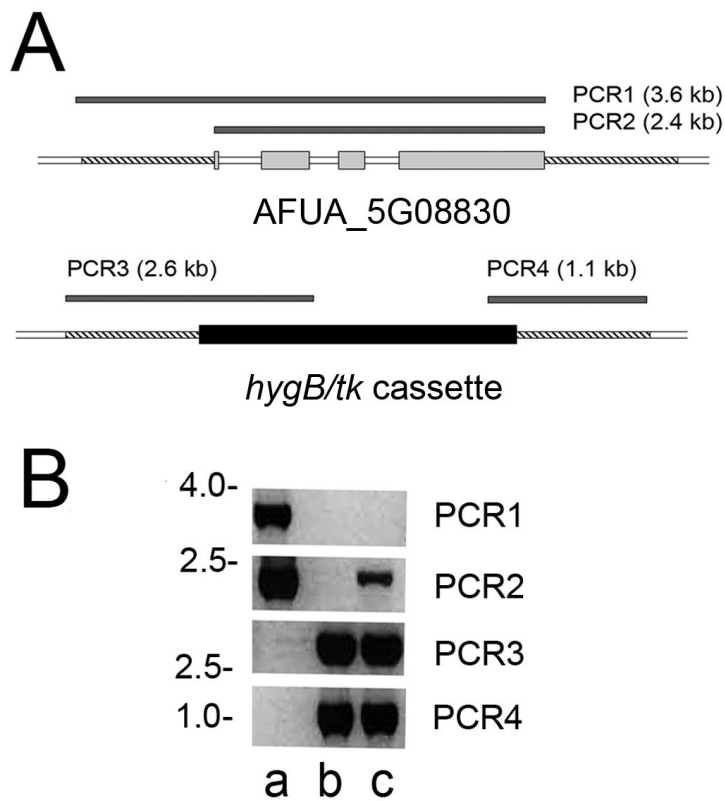
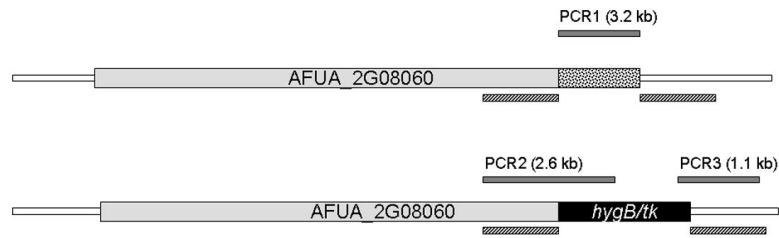


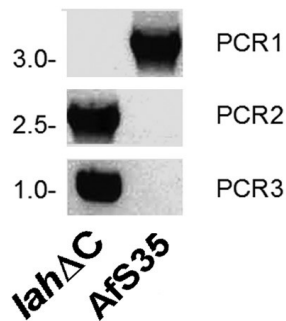
Figure S1: Generation of an *A. fumigatus* Δ *hexA* mutant.

(A) Schematic drawing of AFUA_5G08830 and the deleted *hexA::hph/tk* locus. Approximately 1 kb of the 5' and 3' regions of AFUA_5G08830 (hatched boxes) were used for the construction of the deletion cassette containing a hygromycin resistance (*hygB*) and a thymidine kinase (*tk*) gene. The size and position of the regions amplified by PCR 1-4 are indicated. (B) Equal amounts of genomic DNA were used as template for analytical PCR reactions. The resulting products correspond to the regions indicated in panel A (PCR 1-4). a: parental strain AfS35, b: Δ *hexA* deletion mutant, c: complemented strain Δ *hexA*+*hexA*.

A



B



C

AfS35

lahΔC

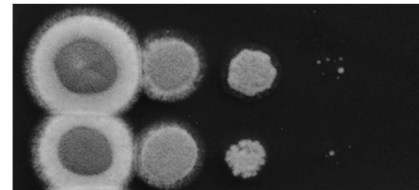


Figure S2: Generation of an *A. fumigatus* mutant lacking the C-terminal domain of Lah.

(A) Schematic drawing of AFUA_2G08060 and the inserted *lahC::hph/tk* cassette in the mutant. Approximately 1 kb up-stream and down-downstream of the target region (indicated as hatched boxes) were fused to a deletion cassette containing a hygromycin resistance (*hygB*) and a thymidine kinase (*tk*) gene. (B) Equal amounts of genomic DNA of AfS35 and the *lahΔC* mutant were used as template for analytical PCR reactions. The resulting products correspond to the regions indicated in panel A (PCR 1-3). (C) Drop dilution assays on plates containing 90 μg Calcofluor white.



Figure S3: Localization of HexA-GFP in *A. fumigatus*.

HexA-GFP has been expressed in AfS35. The micrograph shows an overview demonstrating that Hex-GFP is not targeted to Woronin bodies, but exclusively to the septal pores (arrows). The micrograph shows a projection of several optical planes obtained by confocal microscopy.

A Alignment of *A. fumigatus* HexA (Af) and *N. crassa* HEX-1 (Nc)

```

Af      MGYDDDDGNYHSFRGVERAVDRITHPFHHHHHHHDREEVVIADERGPVRYRDGVREDVR 60
Nc      MGYDDDDAHGH-----VEADAAP-----R 19
        *****.: *                      : : .*                *

Af      IVEPRASKTTAESVPIPCHFIRIGDILILQGRPCQVIRISVSPQTGQHRYLGVDLFTRQL 120
Nc      ATGTGTGSASQTVTIPCHHIRLGDILILQGRPCQVIRISTSAATGQHRYLGVDLFTKQL 79
        . .: ::::*.****.*:*****.*. *****.*:

Af      QEESFVSNPSPSVVVQTM LGPVYKTYRILDLHEDGTITAMTETGDVKQALPVVTQGQLF 180
Nc      HEESFVSNPAPSVVVQTM LGPVFKQYRVLD MQ-DGSIVAMTETGDVKQNLFPVIDQSSLW 138
        :*****:*****:* *:*: *:*.***** *: *:.*:

Af      RKIRDAFSEGRGSRVRLVINDGGRELVDYKVIHGSRL 218
Nc      NRLQKAFESGRGSRVRLVVS DHGREMAVDMKVHGSRL 176
        .::.*.*.*****.*:* *:*.*****

```

B Mutation of the His₇ motif

Wild type HexA

```

1021 GACCGCATCACGCATCCATTCACCAACCACCATCATCAACGATCGTGAGGAAGTAGTC
341 -D--R--I--T--H--P--F--H--H--H--H--H--H--D--R--E--E--V--V--

```



ΔHis₇ mutant

```

1021 GACCGCATCACGCATCCATTCGGCGCCGCGCCGCGCGCGCGATCGTGAGGAAGTAGTC
341 -D--R--I--T--H--P--F--G--A--G--A--G--A--G--D--R--E--E--V--V--

```

C HexA-GFP Intron-Stop

Wild type HexA

```

961 GGT TACTACGACGACGACGGTAACTACCACTCCTTCCGCCGTGGTGTGGAGCGTGCTGTC
321 -G--Y--Y--D--D--D--G--N--Y--H--S--F--R--R--G--V--E--R--A--V--

```



HexA Intron-STOP

```

961 GGT TACTACGACGACGACGGTAACTACCACTCCTTCCGCCGTGATATCTAGCGTGCTGTC
321 -G--Y--Y--D--D--D--G--N--Y--H--S--F--R--R--D--I--*-R--A--V--

```

Figure S4: Mutations of the HexA protein.

Panel A: Alignment of the protein sequences of *A. fumigatus* HexA (Af) and *N. crassa* HEX-1 (Nc). The sequence of region II of HexA is indicated. Panel B: Mutation of the His₇ motif of HexA. Alignment of a partial sequence of the wild type HexA and the mutated allele. Panel C: Introduction of a STOP codon in the HexA intron sequence. Alignment of a partial sequence of wild type HexA and the mutated allele. The STOP codon is indicated by an asterisk. All amino acid sequences are depicted in one letter code.

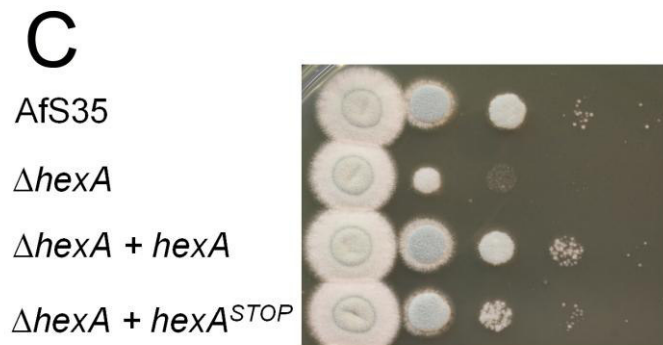
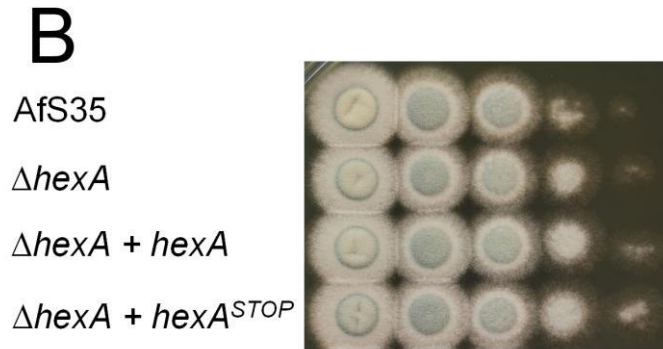
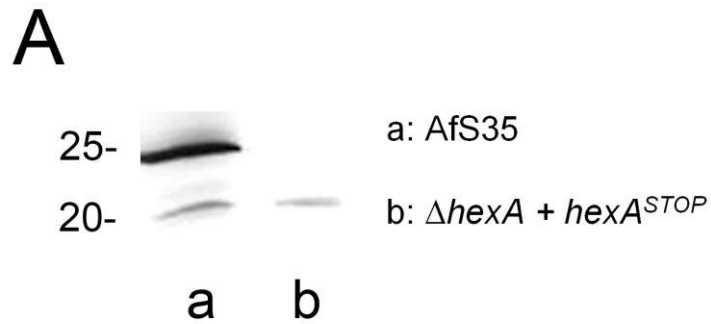


Figure S5: Expression of HexA^{STOP} in the $\Delta hexA$ mutant.

Panel A: Immunoblot of protein extracts of the wild type strain AfS35 and the $\Delta hexA$ mutant complemented with a mutated *hexA* allele harboring a STOP codon in the intron sequence (compare Supplementary Figure 2C). HexA proteins were detected using monoclonal antibody Y157. Panel B and C: Drop dilution assays on a control plate (B) and a plate supplemented with 90 μ g/ml Calcofluor white (C).

3. Diskussion

Die Häufigkeit invasiver pilzlicher Infektionen nahm in den letzten Jahrzehnten unaufhörlich zu. Die Todesrate verblieb dabei konstant hoch bei 80% (Lin *et al.*, 2001). Der Grund hierfür liegt vor allem in der nach wie vor ungenügenden Wirksamkeit antifungaler Medikamente (McCormick *et al.*, 2010a). Dies macht die Suche nach neuen geeigneten Zielstrukturen umso notwendiger. Als besonders vielversprechend präsentieren sich Strukturen, die bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität eine zentrale Rolle einnehmen.

Die Hyphe stellt im Verlauf einer invasiven Infektion mit *A. fumigatus* den entscheidenden Morphotyp dar. Durch das apikale Wachstumsverhalten treiben Hyphen mittels aktiver Invasion in umliegende Gewebe und das Überschreiten wirtsspezifischer Barrieren die Infektion stetig voran. Könnte man die Hyphe in ihrem Wachstum hemmen, hätte man einen Weg gefunden *A. fumigatus* aktiv bei der Invasion zu stören. Als erfolgversprechend zeigen sich dabei die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Woronin Körper, welche durch den Verschluss der Septen die zelluläre Integrität der Hyphe bewahren und somit einen wichtigen Beitrag zur Stressresistenz filamentöser Pilze leisten. Die Struktur von Woronin Körpern sowie deren Verankerungs-Mechanismen waren zu Beginn dieser Arbeit bereits in *N. crassa* beschrieben worden. Es wurde angenommen, dass die in *N. crassa* beteiligten Moleküle und Strukturen im Wesentlichen auch auf andere filamentöse Pilze übertragbar sind. Es zeigte sich im Verlauf dieser Arbeit jedoch recht schnell, dass *N. crassa* eher eine Ausnahme unter den filamentösen Pilzen darstellt und als Modellorganismus daher nicht in Frage kommt.

3.1 Woronin Körper in *Neurospora crassa*

Neurospora crassa ist ein rasant wachsender Pilz mit ungewöhnlich breiten Hyphen. Um den schnellen apikal gerichteten Cytoplasmafluss durch die septale Pore gewährleisten zu können, entwickelten sich in *N. crassa* Woronin Körper, die nicht in direkter Verbindung mit der septalen Pore stehen, sondern mit der lateralen Zellwand verbunden sind. Eine Verankerung von Woronin Körpern an der septalen Pore wäre mit dem herrschenden extensiven Cytoplasmastrom nicht vereinbar. Die Verankerung von Woronin Körpern an der lateralen Zellwand wird in *N. crassa* von dem Protein LAH-1 übernommen, welches neben LAH-2 Bestandteil des sogenannten *leashin* Locus ist (Ng *et al.*, 2009). Der N-Terminus von LAH-1 bindet an den C-Terminus des Woronin Körper-spezifischen Membran Proteins WSC, wohingegen der C-Terminus von LAH-1 mit einem unbekannten Rezeptor an der Zellwand

interagiert. Die Funktion von LAH-2, welches an der Hyphenspitze und der septalen Pore bindet, konnte bis heute noch nicht geklärt werden.

Interessanterweise stellt die Expression eines Fusionsproteins, welches LAH-1 und LAH-2 miteinander verbindet, die Verbindung von Woronin Körpern mit dem Septum wieder her, wie sie für gewöhnlich in anderen filamentösen Ascomyceten, *A. fumigatus* eingeschlossen, beobachtet wird (Ng *et al.*, 2009). Es wurde daher angenommen, dass sich das für *Neurospora* charakteristische Verteilungsmuster von Woronin Körpern durch die Teilung eines einzigen ursprünglichen *leashin* Gens in *LAH-1* und *LAH-2* entwickelt hat (Jedd, 2011).

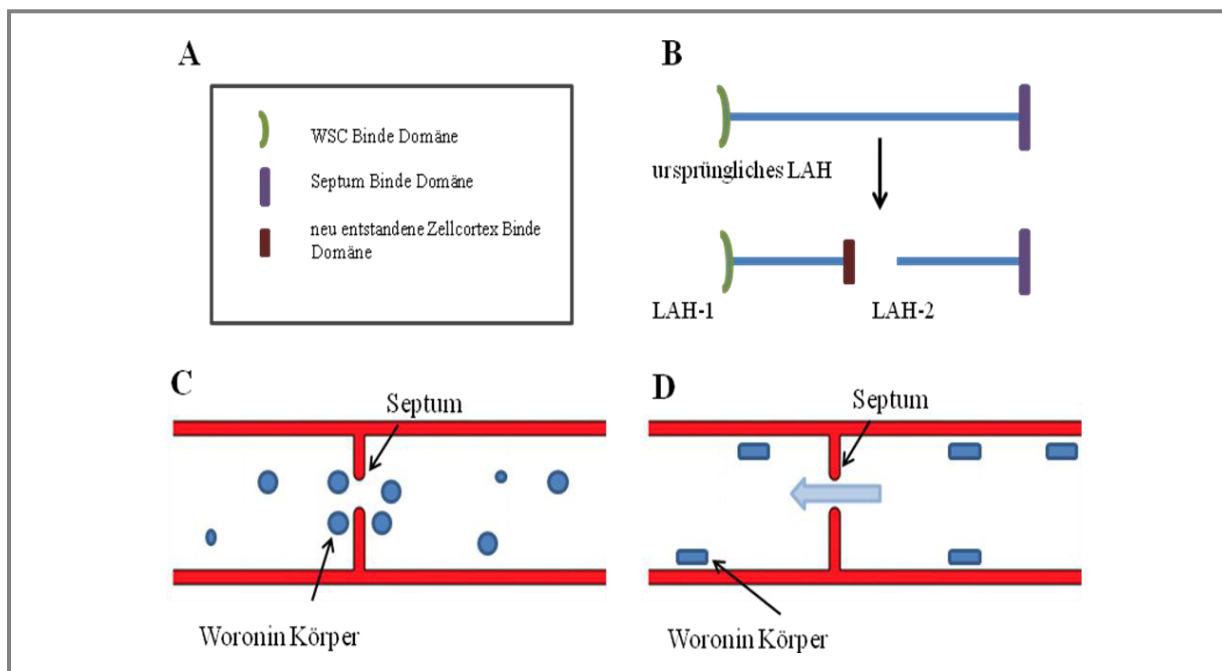


Abb. 1: Schematisches Modell zur Entstehung der Woronin Körper Verteilung in filamentösen Ascomyceten.

(A) Die Legende beinhaltet Symbole, die verschiedene Domänen des in (B) gezeigten Modells des *leashin* Tethers benennen. (B) Evolutionsmodell der Entstehung von LAH-1 und LAH-2 aus einem einzigen ursprünglichen LAH Protein. (C) Modell der Woronin Körper Verteilung, wie sie in den meisten filamentösen Ascomyceten, *A. fumigatus* eingeschlossen, vorgefunden wird. (D) Modell der Verankerung von Woronin Körpern in *Neurospora* und *Sordaria* an der lateralen Zellwand. Der Pfeil demonstriert den gerichteten Cytoplasmafluss, der bei *Neurospora* und *Sordaria* charakteristisch ist (modifiziert nach Ng. *et al.*, 2009).

3.2 Woronin Körper in *Aspergillus fumigatus*

Die Größe von Woronin Körpern variiert abhängig von der jeweiligen Art zwischen 100 nm und über 1 μm (Dhavale and Jedd, 2007). Interessanterweise ist die Größe dieser Organellen in verschiedenen Pilzen generell größer als der innere Durchmesser der jeweiligen septalen Pore (Markham and Collinge, 1987). Es muss demnach einen Mechanismus geben, der sowohl die Bildung des Hex Proteins als auch die Größe von Woronin Körpern unterschiedlicher Pilze kontrollieren kann.

Die meisten filamentösen Ascomyceten, *A. fumigatus* eingeschlossen, weisen rund geformte Woronin Körper auf, wohingegen *N. crassa* hexagonale und relativ große Woronin Körper besitzt (Dhavale and Jedd, 2007; Ng et al., 2009). Die Unterschiede in der Struktur und Größe von Woronin Körpern abhängig von der jeweiligen Art lässt vermuten, dass unterschiedliche Proteinmengen für die Bildung dieser Organellen notwendig sind.

Woronin Körper des filamentösen Pilzes *A. fumigatus* bestehen zum größten Teil aus dem Protein HexA, welches laut Datenbankeintrag ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 61 kDa besitzt. Das HEX-1 Protein in *N. crassa* besitzt dagegen lediglich ein Molekulargewicht von 19 kDa (Jedd and Chua, 2000). Trotz der Vorhersage eines 61 kDa HexA Proteins konnten in dieser Arbeit nach Herstellung entsprechender monoklonaler Antikörper in Immunblots von *A. fumigatus* Hyphenextrakten lediglich zwei Proteinbanden von 25 kDa und 20 kDa eindeutig identifizieren werden.

Homologe Bereiche zwischen *A. fumigatus* HexA und *N. crassa* HEX-1 beschränken sich auf den in Abbildung 2 dunkelblau hervorgehobenen C-terminalen Bereich, welcher mit dem innerhalb aller filamentösen Pilze konservierten Motif MGYDDDD beginnt. Man könnte aus diesen Erkenntnissen schließen, dass der Promoter des HexA Proteins entweder nicht korrekt annotiert wurde oder der N-terminale Bereich des *hexA* einen nicht translatierten Bereich darstellt. Das Auftreten der zwei im Immunoblot detektierten Proteinformen kann durch differentielles Spleißen des *hexA* Gens erklärt werden (Beck et al., 2013b), welches zuvor bereits für *A. oryzae* gezeigt werden konnte (Maryuyama et al., 2005). In *Trichoderma reesei* konnten sogar drei Transkripte des *hex* Gens identifiziert werden (Curach et al., 2004). In *N. crassa* konnten diese Spleiß-Varianten dagegen nicht nachgewiesen werden (Dhavale and Jedd, 2007). Zwar besitzt *N. crassa* ein Intron an einer vergleichbaren Stelle, die Expression einer durchgehenden, nicht gespleißten Form des HEX-1 wird jedoch durch das Fehlen eines durchgehenden Leserasters verhindert. Um die Frage zu klären, ob eine 61 kDa Form des HexA prinzipiell gebildet werden kann, wurde ein GFP-HexA Fusionsprotein hergestellt,

welches den gesamten HexA Locus umfasst. Nach Expression im Wildtyp konnte ein Fusionsprotein von ca. 86 kDa nachgewiesen werden (nicht veröffentlichte Daten). Dies zeigt, dass ein funktionelles Leseraster für eine 61 kDa Form des HexA existiert. Die Bildung eines entsprechenden HexA Proteins kann daher nicht ausgeschlossen werden, es handelt sich jedoch nach den bisherigen Daten lediglich um eine vergleichsweise schwach exprimierte HexA Variante. Diese Erkenntnis sowie die mögliche Funktion solcher HexA Moleküle muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

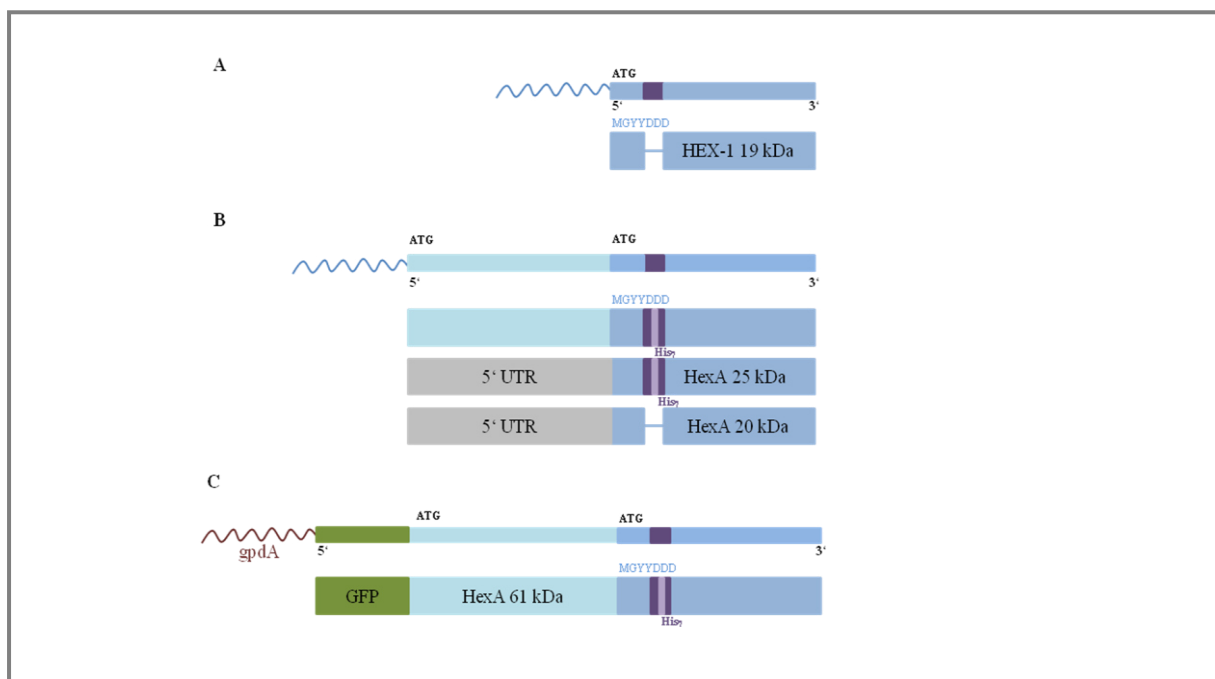


Abb. 2: Vergleich von *A. fumigatus* HexA und *N. crassa* HEX-1

(A) Das HEX-1 Protein in *N. crassa* besitzt ein Molekulargewicht von 19 kDa. Bei *N. crassa* kommt es dabei nicht zum Auftreten verschiedener Proteinvarianten, da das vorhandene Intron nicht im Leseraster ist. (B) Das HexA Protein von *A. fumigatus* besitzt ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 61 kDa, jedoch konnte im Immunblot bisher nur die Expression zweier HexA-Moleküle von 25 kDa und 20 kDa nachgewiesen werden. (C) Ein GFP-HexA Fusionsprotein, welches den gesamten HexA Locus umfasst, führt nach Expression im Wildtyp zur Bildung eines 86 kDa großen Fusionsproteins.

3.3 Entstehung von Woronin Körpern aus Peroxisomen

Das HexA Protein besitzt ein C-terminales peroxisomales *targeting signal*, kurz PTS-1. Dieses führt das Protein zu Peroxisomen, in welchen Woronin Körper gebildet werden und

sich als reife Organellen schließlich davon abschnüren. Woronin Körper bilden sich somit de novo durch Abknospung aus Peroxisomen (Beck *et al.*, 2013b).

In *N. crassa* und *A. nidulans* ereignet sich die Entstehung von Woronin Körpern in wachsenden apikalen Zellkompartimenten. Es wird angenommen, dass Woronin Körper von apikalen zu subapikalen Bereichen des Apex transportiert werden, in denen neue Septen entstehen (Momany *et al.*, 2002). Diese Annahme erscheint sinnvoll, bedenkt man, dass die elastische Hyphenspitze in der Natur einen besonders empfindlichen Bereich der Zellwand darstellt, in dem es unter Stress häufig zur Lyse kommt. Eine apikale Entstehung von Woronin Körpern würde sicherstellen, dass das erste subapikale Zellkompartiment immer funktionelle Woronin Körper aufweist (Dhavale and Jedd, 2007). In Keimlingen und Hyphen von *A. fumigatus* konnte hingegen keine nennenswerte Anreicherung von Woronin Körpern in diesen Bereichen beobachtet werden. Anders als in *N. crassa* und *A. nidulans* konnten in *A. fumigatus* oft Zwischenstadien von Peroxisomen mit noch nicht vollständig abgeschnürten Woronin Körpern an den Septen gefunden werden, während sie an den Hyphenspitzen nur selten nachgewiesen werden konnten. Dieses Stadium scheint in *A. fumigatus* langlebig und funktionell zu sein (Beck *et al.*, 2013b).

3.4 Verteilungsmuster von Woronin Körpern

Woronin Körper des Modelorganismus *N. crassa* unterscheiden sich, im Vergleich zu denen anderer Ascomyzeten, nicht nur in der Größe dieser Organellen, sondern auch in deren spezifischen Lokalisation. *N. crassa* fehlen Woronin Körper, die in direktem Kontakt mit der septalen Pore stehen. Stattdessen sind in diesem Organismus Woronin Körper an der lateralen Zellwand verankert. Unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das *A. fumigatus* HexA Protein, sowie eines GFP-HexA Fusions-Proteins, konnten Woronin Körper in *A. fumigatus* detektiert werden. Zahlreiche Woronin Körper hielten sich verteilt im Cytoplasma auf. Nur einige dieser Organellen zeigten sich assoziiert mit der septalen Pore. Jedoch waren diejenigen Organellen, welche nahe dem Septum platziert waren, mit diesem fest verbunden. Im Cytoplasma verteilte Woronin Körper zeigten sich dagegen hoch dynamisch (Beck *et al.*, 2013b). Im Gegensatz zu *N. crassa*, scheinen Woronin Körper in *A. fumigatus* keine Verbindung zur lateralen Zellwand zu haben. Dieses freie, mobile Verteilungsmuster von Woronin Körpern im Cytoplasma erlaubt keinen ausgeprägten Cytoplasmafluss, wie er in *N. crassa* zu beobachten ist. Ein solcher Cytoplasmafluss würde

ungebundene Woronin Körper in die septale Pore drücken und dadurch zu einer Schließung dieser führen. Welche Funktion diese ungebundenen Organellen haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In *A. fumigatus* tritt ein starker cytoplasmatischer Fluss nur im Falle einer lokalen Schädigung der Zellwand und dem folgenden Austreten des Cytoplasmas auf.

3.5 Woronin Körper: Verschluss der septalen Pore bei drohender Gefahr

Woronin Körper variieren in ihrer Form und Größe, abhängig von der jeweiligen Art, ihre Funktion bleibt jedoch die gleiche: der Verschluss der septalen Pore verletzter Hyphen.

Experimente in *N. crassa* zeigten bereits früh die Bedeutung von Woronin Körpern beim Verschluss der septalen Pore (Trinci and Collinge, 1974). Diese anfänglichen Beobachtungen wurden 1985 durch quantitative Versuche an *Penicillium chrysogenum* bekräftigt. Es konnte gezeigt werden, dass Woronin Körper dieser Art 90% der septalen Poren beschädigter Hyphenkompartimente verschlossen hatten, dagegen nur 5% der Poren intakter Hyphen (Collinge and Markham, 1985).

Eine Deletion des *HEX-1* Gens führt in *N. crassa* zum vollständigen Verlust von Woronin Körpern. Die resultierenden Phänotypen reichen von einem exzessiven Verlust von Cytoplasma, ausgelöst beispielsweise durch Fluten der Hyphen mit destilliertem Wasser (Jedd and Chua, 2000), bis zu einem vermindertem Wachstum auf Minimal Medium sowie einem Defekt in der Sporulation (Jedd and Chua, 2000; Tenney *et al.*, 2000). Auch eine Deletionsmutante des entsprechenden *A. fumigatus hex* Gens führte wie bereits in *N. crassa* beschrieben zur völligen Abwesenheit von Woronin Körpern. Nach induzierter Lyse von *A. fumigatus* Hyphen durch Behandlung mit Zellwandstressoren, wie beispielsweise Calcofluorweiß oder Congorot konnten beschädigte Zellkompartimente nicht mehr durch Woronin Körper verschlossen werden und es kam zu einem signifikant erhöhten Verlust von Cytoplasma. Ein Effekt auf das Wachstumsverhalten oder die Sporulation konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine $\Delta hexA$ -Mutante resistent gegen hypo-osmotischen Stress (Beck *et al.*, 2013c). Im direkten Vergleich hat der Verlust von Woronin Körpern für *A. fumigatus* weitaus geringere Folgen als für *N. crassa* beschrieben. Ein Grund für diesen Unterschied könnte die zuvor erläuterte zelluläre Architektur von *N. crassa* sein. Der septale Porendurchmesser von *N. crassa* überschreitet den von *A. fumigatus* um das Dreifache. Es könnte *A. fumigatus* daher leichter fallen, den Verlust von Woronin Körpern zu

kompensieren. Mikroskopische Beobachtungen einer $\Delta hexA$ -Mutante zeigten, dass es nach lokaler Schädigung der Zellwand trotz des Verlustes von Woronin Körpern vereinzelt zum Verschluss septaler Poren kommt. *A. fumigatus* scheint also alternative Möglichkeiten zu besitzen, um auch in Abwesenheit von Woronin Körpern die septalen Poren zu schließen. Eine Option stellt der nach einer Verletzung ausströmende cytoplasmatische Fluss dar, der im Cytoplasma befindliche Organellen in die septale Pore drücken könnte. Alternativ können auch andere Septum-assoziierte Elemente, wie beispielsweise das sogenannte SOFT Protein, für den Verschluss der Septen verantwortlich gemacht werden (Fleissner and Glass, 2007; Maruyama *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2012). Es ist jedoch festzustellen, dass solche alternativen Verschlussmechanismen den Verlust von Woronin Körpern nicht vollständig ausgleichen können.

Während einer Infektion mit *A. fumigatus* sehen sich eindringende pilzliche Hyphen einem Angriff von Immunzellen gegenübergestellt, welcher zu einer Schädigung der Zellwand und zur Zerstörung der pilzlichen Membran führt. Um die Virulenz einer $\Delta hexA$ -Mutante zu untersuchen, wurden Infektionsversuche in Mäusen durchgeführt. Diese zeigten, dass das Fehlen von Woronin Körpern zu einer abgeschwächten Virulenz führt (Beck *et al.*, 2013c). Woronin Körper stellen somit einen wichtigen Bestandteil der Stressresistenz von *A. fumigatus* dar und kommen daher als potentielle Angriffsstrukturen für neue Therapeutika in Frage. Diese könnten beispielsweise in Kombination mit Echinocandinen eingesetzt werden, die durch Hemmung der β -1,3-D-Glucan-Synthese die pilzliche Zellwand angreifen und zur Lyse führen.

3.6 Verankerung von Woronin Körpern am Septum durch das *tether*-Protein Lah

Wie bereits erwähnt werden Woronin Körper in *N. crassa* an der lateralen Zellwand verankert (Ng *et al.*, 2009). In den meisten anderen Ascomyceten finden sich Woronin Körper mit dem Septum assoziiert. Es wurde bereits vor einiger Zeit erkannt, dass Woronin Körper, die mit einer Laser-Pinzette vom Septum entfernt wurden, anschließend wieder in ihre Ausgangsposition zurückkehren. Die Vermutung lag nahe, dass Woronin Körper durch elastische Strukturen mit der Zellwand verankert sind (Berns *et al.*, 1992; Momany *et al.*, 2002). Wenige Jahre später wurde diese Struktur in *N. crassa* als sogenanntes *leashin* Protein identifiziert (Ng *et al.*, 2009). Der *leashin* Locus ist dabei verantwortlich für die Kodierung von *LAH-1* und *LAH-2*. Das für die Bindung der Woronin Körper an die Zellwand relevante

Protein in *N. crassa* ist LAH-1. Dieses bindet Woronin Körper durch die Interaktion seines N-Terminus mit dem Woronin Körper spezifischen Membran Protein WSC. Der entsprechende C-Terminus des LAH-1 bindet an einen bis jetzt unbekannten Rezeptor an der Zellwand. Datenbank-Recherchen ergaben, dass lediglich ein kleiner Abschnitt von diesem *leashin* Locus, der dem C-Terminus von *LAH-2* entspricht in anderen filamentösen Ascomyceten konserviert ist. Der LAH-1 *Tether* existiert in den meisten Ascomyceten nicht, findet sich also nur in *Neurospora* und *Sordaria*. Diese Daten stellen das Modell der Evolution des *Tether* Proteins, wie es von Ng *et al.* (2009) formuliert wurde, in Frage.

Während *A. fumigatus* ein Homolog zu LAH-1 aus *Neurospora* fehlt, zeigt es Homologien zu einen auf den C-Terminus begrenzten Bereich des LAH-2. Dieses Protein (AFUA_2G08060) wurde im Verlauf dieser Arbeit Lah (für *leashin*) genannt und ähnelt dabei mit einem Molekulargewicht von ca. 6000 kDa LAH-1 und LAH-2 in *Neurospora*. Durch Verwendung von Fusionsproteinen, bei denen N- und C-terminale Domänen von *A. fumigatus* Lah mit GFP fusioniert wurden, konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des *lah* für die Bindung an die septale Pore verantwortlich ist, der N-Terminus wiederum an die Oberfläche der Woronin Körper bindet (Beck *et al.*, 2013c). Experimente mit einer Mutante, in welcher der C-terminale Bereich von *lah* deletiert wurde, bestätigten, dass dieser Bereich für die Bindung von Woronin Körpern an das Septum verantwortlich ist, da lediglich freie Woronin Körper im Cytoplasma beobachtet werden konnten. Interessanterweise zeigten mikroskopische Aufnahmen, dass es in dieser $\Delta lahC$ -Mutante oft zu Clusterbildungen mehrerer im Cytoplasma befindlicher Woronin Körper kam. Elektronen-mikroskopische Aufnahmen erkannten in *A. nidulans* schon früh einen Hinweis auf eine filamentöse Eigenschaft des *tether* Proteins (Momany *et al.*, 2002). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich einzelne unabhängige *tether* Proteine zu einer Faser verbinden. Das LAH-1 Protein in *Neurospora* weist auffällige repetitive Sequenzen auf, die an diesem Multimerisierungs-Prozess beteiligt und sowohl für die Aufrechterhaltung des Abstandes zwischen Woronin Körper und der Zellwand als auch für die Elastizität dieses *Tethers* verantwortlich sein könnten (Jedd, 2010). Diese Sequenzen zeigen keine Konservierung in *Aspergillus* Lah, jedoch besitzt dieses stattdessen sich wiederholende Poly-Lysin Bereiche (Beck *et al.*, 2013c). Da es sich bei der $\Delta lahC$ -Mutante lediglich um eine Deletion des C-terminalen Bereichs von *lah* handelt, konnte das Restprotein nach wie vor an Woronin Körper binden. Es konnte demnach zu einer Interaktion zwischen den verkürzten Lah Proteinen kommen, die letztlich zu den beobachteten Clusterbildungen von Woronin Körpern führten (Beck *et al.*, 2013c).

Unsere Daten zeigen eindeutig, dass *lah* für die Bindung von Woronin Körper an das Septum verantwortlich ist. Nach wie vor unbeantwortet blieb die Frage, wie *lah* an die Oberfläche der Woronin Körper bindet. In *N. crassa* konnte gezeigt werden, dass LAH-1 an den C-Terminus des Woronin Körper Membran Proteins WSC bindet (Ng *et al.*, 2009). WSC und das entsprechende *A. fumigatus* Homolog WscA teilen sich wesentliche Homologien, jedoch zeigte sich auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Organismen. *A. fumigatus* WscA fehlt der C-terminale Abschnitt, der in *N. crassa* für die Interaktion zwischen WSC und LAH-1 verantwortlich ist. Sequenzhomologie-Suchen ergaben, dass dieser Bereich des WSC Proteins ausschließlich in *Neurospora* und *Sordaria* zu finden ist. Wenn WscA in *A. fumigatus* nicht der Bindungspartner für Lah ist, welcher Bindungspartner für WscA könnte dann in Frage kommen?

Ein HexA-GFP Fusionsprotein dessen C-terminales PTS-1 Motif blockiert wurde, führte in *N. crassa* zu einer cytoplasmatischen Verteilung, in *A. fumigatus* dagegen kam es zu einer Bindung an die septale Pore (Beck *et al.*, 2013c). Um die Frage beantworten zu können, ob diese Bindung eines HexA-GFP Fusionsproteins abhängig von WscA ist, wurde dieses Fusionsprotein in einer $\Delta wscA$ Mutante exprimiert. Die Expression führte zur gleichen distinkten Lokalisation des Konstrukts an der septalen Pore (nicht veröffentlichte Daten). Das beschriebene Muster ähnelte damit sowohl dem zuvor in einer $\Delta hexA$ Mutante als auch der im Wildtyp beobachteten Lokalisierung dieses Fusionsproteins. Dies demonstriert, dass WscA für die Interaktion zwischen HexA-GFP und Lah, dessen C-terminaler Bereich, wie zuvor beschrieben, für die Bindung an die septale Pore verantwortlich ist, nicht benötigt wird. Diese Ergebnisse legten unerwarteter weise nahe, dass das HexA Protein selbst für die Bindung von Lah an Woronin Körper verantwortlich sein könnte.

Die Expression des HexA-GFP Fusionsproteins im *A. fumigatus* Wildtypstamm AfS35 führte bei genauer Betrachtung zur Bildung zweier Substrukturen: einer umfangreicheren Struktur direkt an der septalen Pore und einer schwächeren entlang der septalen Zellwand (Abbildung 3).

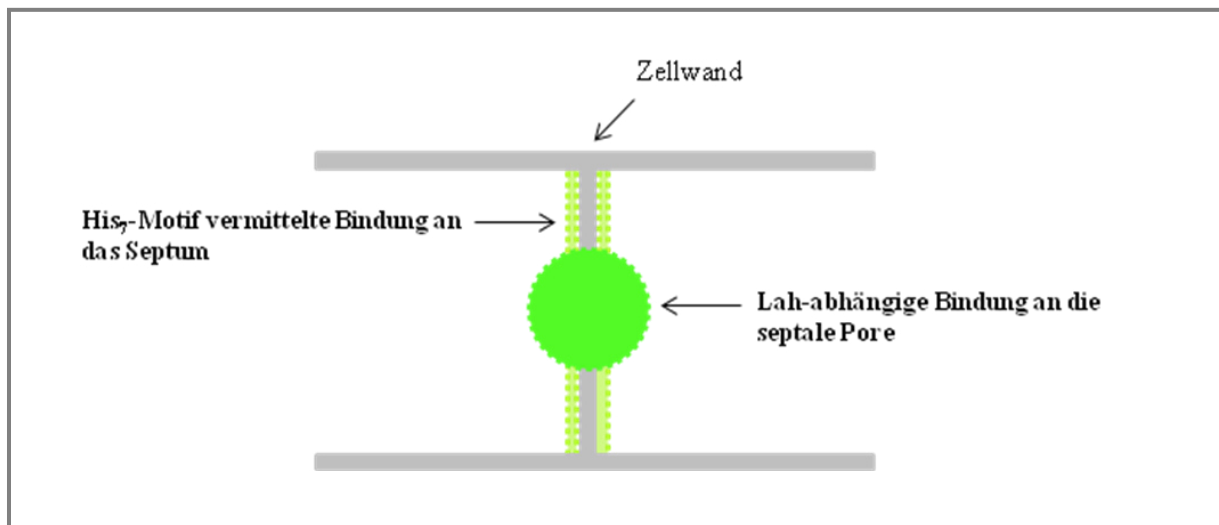


Abb. 3: Lokalisation von HexA-GFP im *A. fumigatus* Wildtypstamm AfS35.

Die Expression des HexA-GFP Fusionsproteins im *A. fumigatus* Wildtypstamm AfS35 führte zur Bildung zweier Substrukturen: einer umfangreicheren Struktur direkt an der septalen Pore und einer schwächeren entlang der septalen Zellwand. Die beobachtete Struktur an der septalen Pore scheint dabei Lah-abhängig zu sein. Die Bindung an das Septum hingegen wird von dem in Exon 2 befindlichen His₇ Motif vermittelt.

Das HexA Protein gliedert sich in drei Teilbereiche: einen kurzen N-terminalen Abschnitt (Exon 1), einen zentralen Abschnitt (Exon 2) und einen größeren C-terminalen Bereich (Exon 3). Exon 2 kann dabei, wie bereits in Punkt 6.3 beschrieben, durch alternatives Spleißen entfernt werden. Erneut zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass in *N. crassa* kein alternatives Spleißen stattfinden kann. Die Vermutung lag nahe, dass Exon 2 in *A. fumigatus* für die Bindung der Woronin Körper an das Septum verantwortlich sein könnte.

Untersuchungen mit verkürzten und genetisch veränderten HexA-GFP-Fusionsproteinen zeigten, dass alle Fusionsproteine, welchen benanntes Exon 2 fehlte, nicht mehr im Stande waren, an die septale Pore zu binden. Die Daten lassen vermuten, dass dieser Bereich des HexA tatsächlich für die Bindung an die Pore verantwortlich sein könnte. Exon 2 weist dabei ein auffälliges Poly-Histidin Motif auf, welches innerhalb vieler Hex Proteine konserviert ist, jedoch nicht in *Neurospora* HEX-1. Ein HexA-GFP Fusionsprotein, dessen Poly-Histidin Motiv genetisch verändert wurde, zeigte nach Expression im *A. fumigatus* Wildtypstamm keine Bindung ans Septum, konnte jedoch nach wie vor an die septale Pore binden. Nach Expression dieses HexA-GFP Fusionsproteins mit beschriebenen genetisch veränderten Poly-

Histidin Motif in einer *lahΔC* Mutante konnte keine Lokalisation an das Septum und die septale Pore beobachtet werden. Das Poly-His-Motif scheint somit für die Bindung an das Septum, nicht jedoch für die Bindung an die septale Pore verantwortlich zu sein. Die Bindung von HexA-GFP an die septale Pore ist hingegen abhängig von Lah. Diese unerwartete Beobachtung lässt vermuten, dass der N-Terminus von HexA den Rezeptor für Lah auf der Oberfläche von Woronin Körpern darstellt. Wenn HexA selbst der Interaktionspartner für die Bindung von Woronin Körpern an das *tether* Protein Lah ist, müssten Teile des HexA auf der Oberfläche der Woronin Körper präsentiert werden, um an Lah binden zu können.

Wie zuvor besprochen, ist der N-terminale Bereich von Lah für die Bindung an Woronin Körper verantwortlich. In einer $\Delta wscA$ Mutante führte die Expression von Lah-N-GFP jedoch nicht zur Bindung an Woronin Körper, sondern zu einer cytoplasmatischen Verteilung des Fusionsproteins. In Abwesenheit von WscA kann HexA-GFP zwar an Lah binden, Lah ist aber nicht fähig mit seinem Partner-Protein auf der Oberfläche von Woronin Körpern zu interagieren (nicht veröffentlichte Daten). Auch bei der Lokalisation der Woronin Körper zeigt die $\Delta wscA$ Mutante einen bemerkenswerten Phänotyp. Während im *A. fumigatus* Wildtyp Stamm AfS35 Woronin Körper am Septum und im Cytoplasma vorkommen, können in der $\Delta wscA$ Mutante nur die im Cytoplasma befindlichen Woronin Körper nachgewiesen werden (nicht veröffentlichte Daten). Die Daten zeigen demnach, dass WscA zwar für die Bindung von Woronin Körpern ans Septum nötig ist, jedoch nicht für die Lah-abhängige Lokalisierung von HexA-GFP an die septale Pore benötigt wird. Der Lah Rezeptor in *A. fumigatus* konnte zwar noch nicht eindeutig identifiziert werden, jedoch präsentiert sich HexA als geeigneter Kandidat.

Das zuvor besprochene WscA Protein stellt ein Transmembran Protein der PMP22/MPV17 Gen-Familie dar. Es konnte gezeigt werden, dass PMP22 in Säugetieren Oligomere bildet, welche Kanäle in der peroxisomalen Membran erzeugen und so den Transport kleiner Moleküle erlauben (Rokka *et al.*, 2009). Für *N. crassa* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass WSC Oligomere bildet und dabei mit dem HEX-1 Protein in Interaktion tritt (Liu *et al.*, 2008). Man könnte daher spekulieren, dass das WscA Protein in *A. fumigatus* in der Lage ist Poren zu bilden, die es WscA assoziierten HexA Molekülen erlauben würden, deren N-Terminus an der Oberfläche von Woronin Körpern zu präsentieren, um dort mit Lah in Verbindung treten zu können (Beck *et al.*, 2013b). Dieser N-terminale Bereich würde dabei das zuvor erläuterte Exon 1 und Exon 2, welches laut den erbrachten Daten für die Bindung an Lah verantwortlich erscheint, umfassen.

3.7 Ausblick

Eine verbesserte Behandlung von durch *A. fumigatus* ausgelösten Infektionen erfordert neue Erkenntnisse, wie dieser filamentöse Pilz effektiv geschwächt werden kann. Die Suche nach neuen Zielstrukturen verlangt dabei nach einem tiefgreifenden Verständnis für die in *A. fumigatus* ablaufenden zellulären Mechanismen, wie beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Woronin Körper, die wesentlich an der Stressresistenz und Virulenz von *A. fumigatus* beteiligt sind.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeichnen ein neues Modell für den Verankerungsmechanismus dieser Organellen am Septum, wie er vermutlich für die meisten filamentösen Ascomyceten, ausgenommen *Neurospora* und *Sordaria*, Gültigkeit besitzt. Mithilfe der hergestellten Werkzeuge konnten wesentliche Einblicke in den Ablauf zellulärer Mechanismen erlangt werden, die es uns erlauben, *A. fumigatus* besser zu verstehen und uns damit in der Bekämpfung dieses pathogenen Organismus einen weiteren Schritt voranbringen. Jedoch bleiben auch offene Fragen zurück. Nach wie vor fehlt der Nachweis einer direkten Bindung von HexA und Lah. Dies könnte beispielsweise durch *yeast-two-hybrid* Versuche geklärt werden. Weiterhin bleibt die postulierte Funktion des WscA nachzuweisen sowie die Identifizierung des Lah Rezeptors oder Bindepartners an der septalen Pore. All diese Fragen können zukünftig mit Hilfe der bisherigen Erkenntnisse und der bereits hergestellten Hilfsmittel geklärt werden.

4. Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, der nach Inhalation seiner Sporen bei immunsupprimierten und immungeschwächten Patienten eine oft letale Invasive Aspergillose auslösen kann. Damit gilt dieser als das derzeit bedeutendste Luftübertragene Pilz-Pathogen.

Hyphen filamentöser Pilze wachsen polar durch Ausdehnung ihrer apikalen Bereiche. Bei invasiven Infektionen mit *A. fumigatus* stellen Hyphen durch aktive Invasion in umliegende Gewebe und Überschreiten wirtsspezifischer Barrieren den entscheidenden Morphotyp dar. Die schlauchförmig elongierten und aneinandergereihten Zellen sind dabei durch Kanäle, die septalen Poren, miteinander verbunden. Diese multizelluläre Organisationsform erlaubt den Transport von Cytoplasma und Organellen zwischen benachbarten Zellen und gestattet so eine zelluläre Kooperation, die das invasive Wachstum dieses saprotrophen und pathogenen Pilzes unterstützt. Jedoch birgt diese Organisationsform auch das Risiko unkontrollierten cytoplasmatischen Ausblutens bei Beschädigung der hyphalen Zellwand.

Woronin Körper entwickelten sich in filamentösen Ascomyceten, um die septale Pore als Antwort auf eine zelluläre Schädigung zu verschließen. Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation der Woronin Körper am Septum zu analysieren und die Bedeutung dieser Organellen für die Stressresistenz und Pathogenität von *A. fumigatus* zu untersuchen. Das derzeitige Wissen über die Organisation und Funktion von Woronin Körpern basiert im Wesentlichen auf in *Neurospora crassa* erbrachten Erkenntnissen. Im Verlauf dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass *N. crassa*, ein filamentöser Pilz, der durch ein sehr schnelles Wachstum und einen kontinuierlichen und schnellen cytoplasmatischen Fluss gekennzeichnet ist, sich deutlich von anderen filamentösen Pilzen, wie dem hier behandelten *A. fumigatus*, unterscheidet.

Das Hex Protein stellt den Hauptbestandteil von Woronin Körpern filamentöser Pilze dar. Ein GFP-HexA Fusionsprotein sowie die Verwendung entsprechender monoklonaler Antikörper gaben Aufschluss über die Lokalisation und Verteilung von Woronin Körpern. In intakten Hyphen von *A. fumigatus* konnten rund geformte Organellen sowohl fest verankert am Septum als auch zahlreich frei beweglich und hoch dynamisch im Cytoplasma beobachtet werden. Eine Fusion des RFPs an die peroxisomale *targeting* Sequenz von HexA in Kombination mit GFP-HexA erlaubte es die Entstehung von Woronin Körpern aus Peroxisomen nachvollziehen zu können. Woronin Körper aller filamentösen Ascomyceten

entstehen de novo durch Abschnürung von Peroxisomen. In *A. fumigatus* findet die Entstehung von Woronin Körpern im Unterschied zu *N. crassa* nicht bevorzugt in apikal gelegenen Bereichen der Hyphe statt. Interessanterweise konnten in *A. fumigatus* oft Zwischenformen aus Peroxisomen und noch nicht vollständig abgeschnürten Woronin Körpern nahe dem Septum, wie auch verteilt im Cytoplasma nachgewiesen werden. Diese schienen langlebig und funktionell zu sein, was bisher in keinem anderen Schimmelpilz beobachtet wurde.

Hexagonale Woronin Körper in *N. crassa* sind mit der lateralen Zellwand verbunden. Woronin Körper von *A. fumigatus* hingegen sind am Septum verankert. Für die Verankerung dieser Organellen in *N. crassa* ist LAH-1, welches neben LAH-2 zum sogenannten *leashin* Locus zählt, verantwortlich. *A. fumigatus* besitzt kein LAH-1 Homolog, aber ein Protein, das Homologien zum C-Terminus des LAH-2 Proteins aufweist (Lah). GFP-Fusionsproteine des N- wie auch C-Terminus von *A. fumigatus* Lah zeigten eindeutig, dass dieses Protein für die Verankerung der Woronin Körper am Septum verantwortlich ist. Die Deletion des C-terminalen Bereichs von Lah, welcher für die Bindung an die septale Pore notwendig ist, hatte das Auftreten von frei beweglichen Woronin Körpern im Cytoplasma zur Folge. Septum-assoziierte Organellen konnten hingegen nicht mehr beobachtet werden.

In *Neurospora* konnte eine Interaktion des LAH-1 mit der C-terminalen Domäne des Woronin Körper Membran-Proteins WSC nachgewiesen werden. Dem *A. fumigatus* Gegenstück WscA, wie auch fast allen anderen WSC-homologen Proteinen der Ascomyceten, fehlt diese C-terminale Domäne. Erstaunlicherweise zeigte sich im Verlauf dieser Arbeit, dass das HexA Protein selbst für die Bindung von Lah an die Oberfläche von Woronin Körpern verantwortlich zu sein scheint. Das Hex Protein gliedert sich in drei Teilbereiche: eine N-terminale Region (Exon 1), einen zentralen Bereich (Exon 2) und einen C-terminalen Bereich (Exon 3). Exon 2 kann dabei durch differentielles Spleißen entfernt werden und weist zudem ein auffälliges Poly-Histidin Motiv auf. Versuche mit einem HexA-GFP Fusionsprotein, dessen C-terminales PTS-1 Motiv blockiert war, ergaben ein spezifisches Lokalisationsmuster: einer breiten Struktur an der septalen Pore und einer schwächeren Färbung entlang der septalen Zellwand. Untersuchungen mit einem HexA Molekül mit genetisch verändertem Exon 2 zeigten, dass dieses Poly-Histidin-Motiv für die Bindung an die septale Zellwand verantwortlich ist. Die Expression dieses genetisch veränderten Fusionsproteins in einer *lahΔC*-Deletionsmutante führte auch zum Verlust der Lokalisation an der septalen Pore. Die Bindung von HexA an die septale Pore scheint somit abhängig von Lah

zu sein. Diese Interaktion zwischen Lah und HexA bewirkt damit die Verankerung der Woronin Körper am Septum. Sequenzvergleiche der beteiligten Proteine legen nahe, dass dies in fast allen filamentösen Ascomyceten so ist.

Woronin Körper variieren in ihrer Form und Größe, abhängig von der jeweiligen Art. Allen gemeinsam bleibt dabei die Funktion dieser Organellen beim Verschluss der septalen Pore verletzter Zellkompartimente. Die Herstellung einer Deletionsmutante des entsprechenden *hexA* Gens in *A. fumigatus* hatte einen vollständigen Verlust von Woronin Körpern zur Folge. Die Deletion des *hexA* Gens führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Stressoren, die die Integrität der Zellwand beeinflussen, wie beispielsweise Calcofluor Weiß und Congo Rot. Eine durch genannte Stressoren induzierte Zell-Lyse führte zu einem vermehrten Austreten von Cytoplasma. Während einer Infektion mit *A. fumigatus* sehen sich Hyphen einem Angriff durch menschliche Immunzellen ausgesetzt. Um Aufschluss über die Virulenz einer *hexA*-Deletionsmutante zu erhalten wurden Mauseinfektionsversuche durchgeführt. Resultat des Verlustes von Woronin Körpern war dabei eine abgeschwächte Virulenz.

Die in dieser Arbeit erbrachten Erkenntnisse führten zu einem neuen Modell der Verankerung von Woronin Körpern am Septum. Dies widerlegt ein kürzlich postuliertes Modell der Evolution dieses speziellen Teils der zellulären Maschinerie filamentöser Ascomyceten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche mit Mutanten, denen Woronin Körper am Septum fehlen, belegen, dass diese Organellen ein wichtiges Element der Stressresistenz von *A. fumigatus* darstellen. Somit erscheinen diese als mögliche Zielstrukturen für neue Therapieansätze im Kampf gegen diesen pathogenen Organismus sehr vielversprechend.

5. Summary

Aspergillus fumigatus is a ubiquitous mould that, after inhalation of its spores, causes lethal invasive aspergillosis in immunosuppressed and immune-compromised patients. For this reason, this organism is currently the most important air borne, pathogenic fungus. Hyphae of filamentous fungi grow in a polar manner by extension of their apical tips. In invasive infections of *A. fumigatus*, hyphae are the morphotype responsible for actively invading neighboring tissues and penetrating host-specific barriers. Individual elongated, tubular hyphal cells are arranged linearly and connected by channels, the so-called septal pores. This multi-cellular organization allows the transport of cytoplasm and organelles between neighboring cells, a cooperation that supports invasive growth of this saprophytic and pathogenic fungus. Such an organization carries the risk of uncontrolled cytoplasmic bleeding if the cell wall is damaged.

Woronin bodies developed in filamentous ascomycetes to close the septal pore in response to cellular damage. The aim of this study was to analyze the mechanism of localization of Woronin bodies at the septum and to explore the importance of these organelles in the stress resistance and pathogenicity of *A. fumigatus*. Current knowledge of the organization and function of Woronin bodies is essentially based on findings in *Neurospora crassa*. In the course of this project, it was shown that *N. crassa*, a filamentous fungus characterized by fast growth and quickly flowing cytoplasm, is distinguished from other filamentous fungi, like the *A. fumigatus* used in this study.

The Hex protein is the main constituent of Woronin bodies of filamentous fungi. Use of a GFP-HexA fusion protein, as well as corresponding monoclonal antibodies revealed the localization and dispersion of Woronin bodies. In intact *A. fumigatus* hyphae round organelles anchored at the septum and a large quantity of highly dynamic and mobile organelles were observed in the cytoplasm. A fusion of RFP to the peroxisomal targeting sequence of HexA combined with GFP-HexA fusion showed the progression of Woronin bodies from peroxisomes. Woronin bodies of all filamentous ascomycetes develop de novo by budding from peroxisomes. In *A. fumigatus* the formation of Woronin bodies, in contrast to *N. crassa*, is not favored at the apical tips. Interestingly, in *A. fumigatus* intermediate forms of peroxisomes and still unseparated Woronin bodies near the septum and dispersed in the cytoplasm were observed. These seem to be functional and long-lasting, a finding not yet demonstrated in other moulds.

Hexagonal Woronin bodies in *N. crassa* are bound to the lateral cell wall. Woronin bodies of *A. fumigatus* are, in contrast, anchored at the septum. In *N. crassa*, LAH-1, which belongs, as LAH-2 does, to the leashin locus, is responsible for anchoring these organelles. *A. fumigatus* does not possess a LAH-1 homolog, but does have a putative protein homologous to the LAH-2 C-terminus (Lah). GFP fusion proteins of the N- and C-terminus of an *A. fumigatus* Lah proved that this protein is responsible for anchoring Woronin bodies at the septum. The deletion of the C-terminus of Lah, which is necessary for binding at the septal pore, results in mobile Woronin bodies in the cytoplasm. Septum-associated organelles were no longer observed.

In *Neurospora*, the C-terminal domain of LAH-1 interacts with the Woronin body membrane protein WSC. The *A. fumigatus* WSC counterpart, as well as all other WSC homologs of ascomycetes, lack this C-terminal domain. Surprisingly, throughout this project, it was revealed that the HexA protein itself seemed to be responsible for the binding of Lah to the surface of Woronin bodies. The HexA protein has three regions: an N-terminal region (exon 1), a central region (exon 2) and a C-terminal region (exon 3). Thereby, exon 2 can be removed by differential splicing; it also has a conspicuous poly-His motif. Experiments with a HexA-GFP fusion protein, the C-terminal PTS-1 targeting sequence of which was blocked, resulted in the appearance of a specific localization pattern: a broad structure at the septal pore and a fainter staining along the septal cell wall. Investigations with a HexA molecule in which exon 2 was mutated, demonstrated that the poly-His motif is responsible for the binding at the septal cell wall. The expression of the mutated fusion protein in a *lahΔC*-deletion mutant lead also to a loss of localization at the septal pore. Binding of HexA at the septal pore seems, therefore, to depend on Lah. This interaction between Lah and HexA triggers the anchoring of Woronin bodies at the septum. Sequence alignments of the corresponding proteins suggest that this is the case in almost all filamentous ascomycetes.

Woronin bodies vary in their shape and size, depending on the specific species. However, the function of these organelles is the same in all species: closing the septal pores of damaged cell compartments. Deletion of the corresponding *A. fumigatus hexA* gene resultated in a complete loss of Woronin bodies. Lack of *hexA* increased sensitivity to cell wall stressors like calcofluor white and congo red. Cell lysis induced by these stressors caused increased cytoplasmic bleeding. During *A. fumigatus* infection, hyphae are confronted with human immune cells. To get an idea of the virulence of a *hexA* deletion mutant, a mouse infection model was used. The loss of Woronin bodies resulted in impaired virulence.

This study introduced a new model for anchoring the Woronin bodies at the septum. This refutes a currently proposed model of the evolution of this specific part of the cellular machinery of filamentous ascomycetes. Experiments described here, using mutants in which the Woronin bodies are absent from the septum, illustrate that these organelles are necessary elements in the stress resistance of *A. fumigatus*. Therefore, Woronin bodies seem to be promising targets for new therapeutic attacks against this pathogenic organism.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.Abbildung
ABPAAllergisch Bronchopulmonale Aspergillose
AIDSAcquired Immune Deficiency Syndrome
C-TerminusCarboxy-Terminus
°CGrad Celsius
CARContractile Actin Ring
CTComputertomographie
DNADesoxyribonukleinsäure
GDPGuanosindiphosphat
GFPGrün fluoreszierendes Protein
GTPGuanosintriphosphat
IAInvasive Aspergillose
IgEImmunglobulin E
IgGImmunglobulin G
kDaKilodalton
m ³Kubikmeter
nmNanometer
N-TerminusAmino-Terminus
PCRPolymerase Chain Reaction
PTS-1Peroxisomal Targeting Signal
RFPRot fluoreszierendes Protein
SINSeptation Initiation Network
SPCSeptal Pore Cap
µmMikrometer
Tab.Tabelle
UTRUntranslatierter Bereich
WSCWoronin Sorting Complex

Literaturverzeichnis

1. **Abad, A., Fernanadez-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramirez, A., Magareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Ponton, J., Garaizar, J., Rementeria, A.,** 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 27(4), 155-182.
2. **Balasubramanian, M.K., Bi, E., Glotzer, M.,** 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol.* 14(18), R806-18.
3. **Barton, R.C.,** 2013. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica*, 459405.
4. **Bauer, B.,** 2010. Untersuchung der Adaption des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* an Stress: Die funktionelle Charakterisierung eines CipC-homologen Proteins. Dissertation.
5. **Beck, J., Wagener, J., Ebel, F.,** 2013a. The septal cell wall of filamentous fungi. In book: The fungal cell wall. Publisher: Nova Publishers. Editor Hector Manuel Mora-Montes. Chapter 5, 129-142.
6. **Beck, J., Ebel, F.,** 2013b. Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol.* 303(2), 90-97.
7. **Beck, J., Echtenacher, B., Ebel, F.,** 2013c. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. *Mol Microbiol.* 89(5), 857-871.
8. **Berns, M.W., Aist, J.R., Wright, W.H., Liang, H.,** 1992. Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. *Exp Cell Res.* 198(2), 375-378.
9. **Bruno, K.S., Morrell, J.L., Hamer, J.E., Staiger, C.J.,** 2001. SEPH, a Cdc7p orthologue from *Aspergillus nidulans*, functions upstream of actin ring formation during cytokinesis. *Mol Microbiol.* 42(1), 3-12.
10. **Buller, A.,** 1933. The translocation of protoplasm through septate mycelium of certain Pyrenomycetes, Discomycetes, and Hymenomycetes. . *Researches on fungi.* Longmans and Green. London. V, 75-167.
11. **Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W.,** 2001. The Fungi, Second Edition. Academic press., London, UK.
12. **Chotirmall, S.H., Al-Alawi, M., Mirkovic, B., Lavelle, G., Logan, P.M., Greene, C.M., McElvaney, N.G.,** 2013. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *BioMed Res Int.* 723129.
13. **Collinge, A.J., Markham, P.,** 1985. Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Experimental Mycology.* 9, 80-85.

14. **Curach, N.C., Te'o V.S., Gibbs M.D., Bergquist, P.L., Nevalainen, K.M.**, 2004. Isolation, characterization and expression of the *hex1* gene from *Trichoderma reesei*. *Gene*. 331, 133-140.
15. **Dagenais, T.R., Keller, N.P.**, 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 447-465.
16. **Denning, D.W.**, 1998. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 26, 781-805.
17. **Denning, D.W., O'Driscoll, B.R., Hogaboam, C.M., Bowyer, P., Niven, R.M.**, 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J.* 27, 615-626.
18. **De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C.A., Denning, D.W., Patterson, T.F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W.E., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kibbler, C.C., Kullberg, B.J., Marr, K.A., Munoz, P., Odds, F.C., Perfect, J.R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B.H., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., Viscoli, C., Wingard, J.R., Zaoutis, T., Bennett, J.E.**, 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of cancer/Invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis.* 46, 1813-21.
19. **Dhavale, T., Jedd, G.**, 2007. The fungal Woronin body. *Biology of the Fungal Cell*, 2nd Edition, The Mycota VIII, R.J. Howard and N.A.R. Gow (Eds.), Springer-Verlag, pp. 87-96.
20. **Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F., Wagener, J.**, 2012. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol.* 83(3), 506-19.
21. **Dickson, M.**, 1963. A study of fine structure of the spores of *Pithomyces chartarum*. *New Zeal. J. Bot.* 1, 381-388.
22. **Dixon, D.M., McNeil, M.M., Cohen, M.L., Gellin, B.G., La Montagne, J.R.**, 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep.* 111, 226-35.
23. **Esser, K.**, 1982. Cryptogams-cyanobacteria, algae, fungi, lichens. Cambridge University Press, London, England.
24. **Fleißner, A., Glass, N.L.**, 2007. SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot Cell.* 6(1), 84-94.
25. **Fresenius, G.W.**, 1863. Beiträge zur Mykologie. Frankfurt a. M., Brönnner, 81-82.
26. **Garrison, R.G., Lane, J.W., Field, M.F.**, 1970. Ultrastructural changes during the yeastlike to mycelial-phase conversion of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol* 101(2), 628-635.
27. **Giron, J., Poey, C., Fajadet, P., Sans, N., Fourcade, D., Senac, J.P., Railhac, J.J.**, 1998. CT-guided percutaneous treatment of inoperable pulmonary aspergillomas: a study of 40 cases. *Eur J Radiol.* 28(3), 235-42.

-
28. **Gow, N.A.R., Gooday, G.W., Newsam, R.J., Gull, K.**, 1980. Ultrastructure of the septum in *Candida albicans*. *Current Microbiology*. Volume 4, Issue 6, pp 357-359.
 29. **Gull, K., Smith, J.E., Berry, D.R.**, 1978. Form and function of septa in filamentous fungi. *The Filamentous Fungi: Developmental Mycology*. Edited by Smith JE, Berry DR. New York: Wiley and Sons. 78-93.
 30. **Hajjaj, H., Niederberger, P., Duboc, P.**, 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol.* 67, 2596-602.
 31. **Harris, S.D., Morrell, J.L., Hamer, J.E.**, 1994. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics*. 136(2), 517-32.
 32. **Harris, S.D.**, 2001. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Cell Biol.* 4, 736-739.
 33. **Hawksworth, D.**, 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 1422-1432.
 34. **Jedd, G. and Chua, N.H.**, 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol.* 2, 226-231.
 35. **Jedd, G.**, 2011. Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol.* 21, 12-19.
 36. **Justa-Schuch, D., Heilig, Y., Richthammer, C., Seiler, S.**, 2010. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 76, 220-235.
 37. **Kim, J.M., Lu, L., Shao, R., Chin, J., Liu, B.**, 2006. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 173, 685–696.
 38. **Klich, M.A.**, 2006. Identification of clinically relevant Aspergilli. *Medical Mycology.* 44, 5127-5131.
 39. **Knutsen, A., Slavin, R.G.**, 1992. Allergic bronchopulmonary mycosis complicating cystic fibrosis. *Semin Respir Infect.* 7(3), 179-92.
 40. **Krapp, A., Simanis, V.**, 2008. An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 3), 411-5.
 41. **Latge, J.P.**, 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol Rev.* 12, 310-350.
 42. **Lai, J., Koh, C.H., Tjota, M., Pieuchot, L., Raman, V., Chandrababu, K.B., Yang, D., Wong, L., Jedd, G.**, 2012. Intrinsically disordered proteins aggregate at fungal cell-to-cell channels and regulate intercellular connectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(39), 15781-15786.
 43. **Lew, R.R.**, 2005. Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology.* 151 (Pt 8), 2685-2692.

-
44. **Lin, S.J., Schranz, J., Teutsch, S.M.,** 2001. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 32, 358-366.
 45. **Liu, F., Ng, S.K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., Jedd, G.,** 2008. Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *J Cell Biol.* 180, 325-339.
 46. **Lucas, W.J., Ham, B.K., Kim, J.Y.,** 2009. Plasmodesmata-bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19, 495-503.
 47. **Managadze, D., Würtz, C., Sichting, M., Niehaus, G., Veenhuis, M., Rottensteiner, H.,** 2007. The peroxin PEX14 of *Neurospora crassa* is essential for the biogenesis of both glyoxysomes and Woronin bodies. *Traffic.* 8, 687-701.
 48. **Markham, P., Collinge, A.J.,** 1987. Woronin bodies of filamentous fungi. *FEMS.* 46, 1-11.
 49. **Markham, P.,** 1994. Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycol Res.* 98, 1089-1106.
 50. **Marr, K.A., Balajee, S.A., McLaughlin, L., Tabouret, M., Bentsen, C., Walsh, T.J.,** 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis.* 190(3),641-9.
 51. **Martin, S.G., Rincon, S.A., Basu, R., Perez, P., Chang, F.,** 2007. Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol. Biol. Cell* 18, 4155–4167.
 52. **Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Ishi, K., Kitamoto, K.,** 2005. Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 1081-1088.
 53. **Maruyama, J., Escano, C.S., Kitamoto, K.,** 2010. AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 391, 868-873.
 54. **McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F.,** 2010b. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol.* 12, 1535-1543.
 55. **Momany, M., Hamer, J.E.,** 1997. Relationship of actin, microtubules, and crosswall synthesis during septation in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38(4), 373-384.
 56. **Momany, M., Richardson, E.A., Van Sickle, C., Jedd, G.,** 2002. Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia.* 94, 260-266.
 57. **Morton, C.O., Loeffler, J., Da Luca, A., Frost, S., Kenny, C., Duval, S., Romani, L., Rogers, T.R.,** 2010. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *J Med Microbiol.* 59, 408-13.
 58. **Ng, S.K., Liu, F., Lai, J., Low, W., Jedd, G.,** 2009. A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS Genet.* 5, e1000521.
 59. **Ni, M., Yu, J. H.,** 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One,* 2(10), e970

-
60. **O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S.,** 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigates*. *Nature*. 457, 471-474.
 61. **Ostrosky-Zeichner, L.,** 2012. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 125, S14-S24.
 62. **Pieuchot, L., Jedd, G.,** 2012. Peroxisome assembly and functional diversity in eukaryotic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol*. 66, 237-263.
 63. **Raper, K., Fennell, D.,** 1965. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Company, Baltimore
 64. **Rasmussen, C.G., Glass, N.L.,** 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 4(11), 1913-25.
 65. **Rokka, A., Antonenkov, V.D., Soininen, R., Immonen, H.L., Pirlä, P.L., Bergmann, U.,** 2009. Pxmp2 is a channel-forming protein in mammalian peroxisomal membrane. *PLoS ONE*. 4, e5090.
 66. **Rustom, A., Saffrich, R., Markoviy, I., Wlather, P., Gerdes, H.-H.,** 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 5660, 1007-1010.
 67. **Sallam, L.A., El-Refai, A.M., Hamdy, A.H., El-Minofi, H.A., Abdel-Salam, I.S.,** 2003. Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *J Gen Appl Microbiol*. 49, 321-8.
 68. **Si, H., Justa-Schuch, D., Seiler, S., Harris, S.D.,** 2010. Regulation of septum formation by the Bud3-Rho4 GTPase module in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 185, 165-176.
 69. **Sosinsky, G.E., Nicholson, B.J.,** 2005. Structural organization of gap junction channels. *Biochimica Biophysica Acta*. 1711, 99-125.
 70. **Soundararajan, S., Jedd, G., Li, X., Ramos-Pamplona, M., Chua, N.H., Naqvi, N. I.,** 2004. Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *Plant Cell*. 16, 1564-1574.
 71. **Spiliotis, E.T., Gladfelter, A.S.,** 2012. Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic*. 13, 195-203.
 72. **Stevens, D.A., Kan, V.L., Judson, M.A., Morrison, V.A., Dummer, S., Denning, D.W., Bennett, J.E., Walsh, T.J., Patterson, T.F., Pankey, G.A.,** 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 30(4), 696-709.
 73. **Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J.I., McClain, C., Bowman, E.J., Bowman, B.J.,** 2000. *Hex-1*, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genet Biolo*. 31(3), 205-217.
 74. **Thompson III, G.R., Patterson, T.F.,** 2008. Pulmonary Aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 28, 103-110.
 75. **Trinci, A.P., Collinge, A.J.,** 1974. Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma*. 80(1), 57-67.

76. **Westfall, P.J., Momany, M.**, 2002. *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophores development. *Mol Biol Cell*. 13(1), 110-118.
77. **Woronin, M.**, 1864. Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pucherrimus* Cr. und einiger Pezizen. *Abh Senkenb Naturforsch*. 5, 344-355.
78. **Zmeili, O.S., Soubani, A.O.**, 2007. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*. 100(6), 317-34.

DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Ebel für die fortwährende Unterstützung in Theorie und Praxis und für sein offenes Ohr bei allen großen und kleinen Problemen im Laboralltag.

Mein Dank gilt auch allen Labor-Mitgliedern der AG Ebel und AG Wagener des Max von Pettenkofer-Instituts für das gute Arbeitsklima und die verlässliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei privaten wie auch wissenschaftlichen Themen:

Allison Seeger, Axel Löwe, Christoph Helmschrott, Emilia Sieger, Johannes Wagener, Karl Dichtl, Marzena Broniszewska, Michael Neubauer, Sweta Samantaray und Zhaojun Zhu.
Danke für die tolle Zeit...

Meiner Familie danke ich herzlich für die geduldige Unterstützung und die vielen kleinen Anregungen. Ohne Euch hätte ich es nicht so weit schaffen können. Danke!